

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAULO ROBERTO DO R. M. DE CARVALHO

O uso do sal de bixina como substituinte do carmim e do
nitrito de sódio em embutidos cárneos frescais

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAULO ROBERTO DO R. M. DE CARVALHO

O uso do sal de bixina como substituinte do carmim e do
nitrito de sódio em embutidos cárneos frescais

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas, no Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha
Garcia

CURITIBA

2016

Carvalho, Paulo Roberto do R. M. de

O uso do sal de bixina como substituinte do carmim e do nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos / Paulo Roberto do R. M. de Carvalho. - Curitiba, 2016. 88 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Bixaceae. 2. Nitrosaminas. 3. Nitrito de sódio. 4. Carmim. I. Garcia, Carlos Eduardo Rocha. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

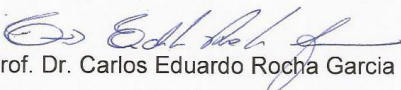
CDD 664.9

TERMO DE APROVAÇÃO

PAULO ROBERTO DO RÊGO MONTEIRO DE CARVALHO


Título: "O uso do sal de bixina como substituinte do carmim e do nitrito de sódio em embutidos cárneos frescais"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia

Orientador


Profª. Drª. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná


Profª. Drª. Cláudia Carneiro Hecke Kruger
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 29 de Março de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida,
presentes em todos os momentos e me apoiando sempre.

Aos meus pais, pela dedicação, carinho,
amor e educação passados a mim.

Ao meu irmão, pelo apoio e companheirismo.

A minha namorada, pelo carinho, amor,
estímulo e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me guiar e demonstrar o caminho da minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia pela colaboração, competência, paciência, incentivo, confiança, conhecimentos passados a mim, pela amizade e oportunidades cedidas desde o período da graduação, além de ser um profissional extremamente competente, cujo exemplo seguirei sempre. Muito obrigado.

Ao prof. Dr. Fábio Murakami, pela valiosa colaboração no auxílio no desenvolvimento do trabalho.

A prof. Dr^a. Maria Lucia Masson por proporcionar a realização de análises do trabalho.

Ao doutorando Vinícius José Bolognesi pela amizade, auxílio em todas as etapas do experimento e discussões sobre o trabalho.

A Luciana, técnica do Laboratório de Controle de Qualidade II pela amizade, e ajuda na realização das análises microbiológicas do trabalho.

A Wandelice Gurski, técnica do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, pelos momentos de convivência, pela amizade e alegria constantes durante o desenvolvimento desse trabalho.

A técnica Maria da Graça, da central analítica do Departamento de Farmácia pelo auxílio nas análises do trabalho.

A minha mãe, Suzana Flora do Rêgo Monteiro de Carvalho pelo carinho, amor, incentivo, compreensão, paciência e por me apoiar sempre que precisei de auxílio. Amo você.

Ao meu pai, Paulo Roberto de Carvalho, por sempre acreditar em mim, me incentivando e apoiando em todas as decisões de minha vida.

Ao meu irmão, Guilherme do Rêgo Monteiro de Carvalho, por estar sempre ao meu lado e me incentivar sempre.

A minha namorada, Gisele Pruchaki Basso, pelo carinho, apoio, compreensão e por fazer acreditar que eu era capaz. Obrigado amor, por me fazer uma pessoa melhor e por todos esses momentos ao meu lado. Amo você.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do mestrado e conhecimentos ofertados pelo corpo docente.

A Universidade Federal pelo fornecimento do Laboratório de Tecnologia de Alimentos para o desenvolvimento da pesquisa, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro e crescimento profissional oportunizados pelo mestrado.

RESUMO

As linguiças toscana são formuladas exclusivamente com matéria prima de origem suína e alcançam elevada aceitação junto à população. Dentre os aditivos comumente utilizados em sua formulação estão os sais de cura, principalmente o nitrito de sódio e o corante carmim de cochonilha. Atualmente, organizações mundiais ligadas à saúde, como a WHO/FAO, recomendam a redução do uso do nitrito em alimentos, devido à formação das nitrosaminas e seu risco à população. Em relação ao carmim, custos de importação do corante e reações alérgicas influenciam seu uso em alimentos. Alternativas para substituição do nitrito, por substâncias naturais apresentando atividade semelhante, têm sido propostas em decorrência do apelo social pela diminuição do sal de cura nos alimentos. O urucum (*Bixa orellana*), vegetal comumente encontrado no Brasil, apresenta em sua composição, a bixina, substância com atividade antioxidante e corante, porém, as características lipofílicas desse composto limitam seu uso em alimentos. Este trabalho teve por objetivo avaliar o uso do sal de bixina como substituinte do carmim e do nitrito de sódio em linguiças toscana. As amostras de linguiça toscana foram formuladas utilizando os seguintes tratamentos: CT (controle), CAR (40 ppm de carmim), NIT (150 ppm de nitrito de sódio), C/N (40 ppm de carmim/150 ppm de nitrito), C/N/B (20 ppm de carmim/75 ppm de nitrito/250 ppm de bixinato de potássio) e BIX (500 ppm de bixinato de potássio). As amostras foram analisadas quanto à oxidação lipídica, nitrito residual, cor, análise microbiológica e sensorial. A presença do sal de bixina pode ser identificada pelos provadores, porém, não causou prejuízo a aceitação ($p < 0,01$). O sal de bixina demonstrou ser uma alternativa ao uso do carmim e nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos. Ainda que não tenha influenciado a contagem microbiana, apresentou ação antioxidante e capacidade de ofertar cor vermelha ao produto promovendo melhoria da aceitação junto aos provadores. Embora o sal de bixina empreste também uma coloração amarela que limita sua aceitação quando comparada a outros aditivos, o uso combinado à substituição parcial de nitrito e carmim pode oportunizar embutidos de qualidade com redução dos níveis desses aditivos. Maiores estudos são necessários para adequar as concentrações utilizadas às particularidades dos processos e características desejáveis pelos consumidores.

Palavras chave: Embutidos, linguiça, bixina, nitrito, carmim

ABSTRACT

The tuscan sausages are made exclusively with raw material of swine origin and reach high acceptance by the population. Among the additives commonly used in formulation are curing salts, mainly sodium nitrite and the cochineal dye. Currently, global health organizations such as the WHO/FAO recommended reducing the use of nitrite in foods, due to the formation of nitrosamines and their risk to the population. In relation to the import costs of Carmine dye and allergic reactions affect your use in food. Alternatives for replacing the nitrite, for natural substances presenting similar activity, have been proposed as a result of social appeal by reducing the curing salt in foods. The annatto (*Bixa orellana*), vegetable commonly found in Brazil, presents in composition, bixin, substance with antioxidant activity and dye, however, lipophilic characteristics of this compound limited use in foods. This study aimed to evaluate the use of salt of bixin as substituent carmine and sodium nitrite in tuscan sausages. The tuscan sausage samples have been formulated using the following treatments: CT (control), CAR (40 ppm of carmine), NIT (150 ppm of sodium nitrite), C/N (20 ppm of carmine/75 ppm of nitrite), C/N/B (40 ppm of carmine/150 ppm of nitrite/ 250 ppm of potassium bixinate) and BIX (500 ppm of potassium bixinate). The samples were analyzed for lipid oxidation, residual nitrite, color, microbiological and sensory analysis. The presence of bixin can be identified by tasters, however, didn't cause prejudice to acceptance ($p < 0,01$). The bixin salt proved to be an alternative to the use of carmine and sodium nitrite in sausages. Although it has not influenced the microbial count, showed antioxidant action and ability to offer red color to the product promoting improvement of acceptance among the tasters. Although the bixin salt also lends a yellow coloration which limits its acceptance when compared to other additives, using combined with partial replacement of nitrite and carmine can enhance quality inlaid with reduced levels of these additives. Larger studies are needed to adapt the concentrations used particularities of processes and desirable characteristics by consumers.

Key words: Sausage, bixin, nitrite, carmine

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura do músculo esquelético.....	21
FIGURA 2 - Esquematização do sistema muscular.....	22
FIGURA 3 - Relação entre os estados de oxidação da mioglobina e a cor da carne.....	23
FIGURA 4 - Esquema geral do mecanismo de oxidação lipídica.....	28
FIGURA 5 - Estrutura do ácido carmínico.....	30
FIGURA 6 - Estrutura do carmim de cochonilha.....	32
FIGURA 7 - Estruturas da bixina e norbixina.....	34
FIGURA 8 - Amostras de linguiça toscana formuladas com concentrações de carmim de cochonilha entre 10 e 40 ppm.....	38
FIGURA 9 - Amostras comerciais de linguiça toscana.....	38
FIGURA 10 - Fluxograma de preparo das formulações de linguiças toscana.....	40
FIGURA 11 - Análise sensorial triangular e ordenação de preferência sob luz vermelha.....	46
FIGURA 12 - Cromatograma, obtido por CLAE, dos carotenóides norbixina (1) e bixina (2).....	48
FIGURA 13 - Efeito das diferentes concentrações de carmim sobre o parâmetro a^* de linguiças toscana.....	56
FIGURA 14 - Intensidade de cor vermelha de amostras comerciais e com diferentes concentrações de carmim de cochonilha.....	56
FIGURA 15 - Parâmetro a^* (cor vermelha) em amostras de linguiça Toscana armazenadas refrigeradas.....	59
FIGURA 16 - Parâmetro a^* (cor vermelha) em amostras de linguiça Toscana armazenadas congeladas.....	59
FIGURA 17 - Parâmetro b^* (cor amarela) das amostras refrigeradas de linguiças tipo Toscana.....	60
FIGURA 18 - Parâmetro b^* (cor amarela) das amostras congeladas de linguiças Toscana.....	61

FIGURA 19 - Parâmetro L* (luminosidade) de amostras refrigeradas de linguiça Toscana.....	62
FIGURA 20 - Parâmetro L* (luminosidade) em linguiças Toscana armazenadas congeladas.....	64
FIGURA 21 - Preferência dos provadores por amostras formuladas com diferentes concentrações de carmim (10, 20, 30 e 40 ppm).....	68
FIGURA 22 - Comparação das amostras 30 e 40 ppm de carmim com amostras comerciais.....	69
FIGURA 23 - Análise sensorial visual por ordenação das amostras armazenadas refrigeradas de linguiça Toscana.....	70
FIGURA 24 - Análise sensorial visual por ordenação de preferência das amostras armazenadas congeladas de linguiça Toscana.....	71
FIGURA 25 - Análise sensorial de gosto por teste triangular de linguiças Toscana.....	72
FIGURA 26 - Análise sensorial de gosto por teste de ordenação de preferência de linguiças Toscana.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Nitrito residual (ppm) ao longo do tempo de prateleira das amostras refrigeradas de linguiça toscana.....51

GRÁFICO 2 - Oxidação lipídica de amostras congeladas de linguiças toscana após 90 dias de armazenamento.....55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Formulação base para o preparo dos tratamentos de linguiças Toscana.....	40
TABELA 2 - Aditivos e suas quantidades adicionadas aos tratamentos de linguiças Toscana.....	41
TABELA 3 - Composição química proximal e pH das matérias-primas e linguiça Toscana.....	51
TABELA 4 - Oxidação lipídica (TBARs) das amostras refrigeradas de linguiças Toscana.....	54
TABELA 5 - Contagem de microrganismos mesófilos das amostras refrigeradas de linguiça Toscana.....	66
TABELA 6 - Contagem de bolores e leveduras das amostras refrigeradas de linguiça Toscana.....	67
TABELA 7 - Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva das amostras refrigeradas de linguiça Toscana.....	67
TABELA 8 - Contagem de coliformes termotolerantes em amostras refrigeradas de linguiça tipo Toscana.....	68

LISTA DE SIGLAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal

BIX – Tratamento com bixina

CA – Ácido Carmínico

CAR – Tratamento Carmim de cochonilha

C/N – Tratamento Carmim/Nitrito

C/N/B – Tratamento com carmim, nitrito e bixina

CT – Tratamento Controle

LT – Linguiça Toscana

NIT – Tratamento Nitrito

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mb – desoximioglobina

MbO₂– oximioglobina

MetMb – metamioglobina

Min. – minutos

TBARS – Substâncias Reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico

UFC – Unidades formadoras de colônia

OMS – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 CARNES	20
3.2 EMBUTIDOS CÁRNEOS	23
3.3 ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA	24
3.4 NITRATO E NITRITO DE SÓDIO	26
3.4 OXIDAÇÃO LIPÍDICA	27
3.5 CORANTES	29
3.6 CARMIM DE COCHONILHA	29
3.7 URUCUM	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Coleta.....	36
4.2 Obtenção da bixina.....	36
4.3 Síntese do bixinato de potássio	37
4.4 Estudo preliminar para a definição da concentração de carmim a ser adicionada aos tratamentos.....	37
4.5 Preparo de amostras de linguiça toscana	39
4.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA PRIMA E EMBUTIDO FRESCAL TIPO TOSCANA.....	41
4.6.1 Determinação de pH	41
4.6.2 Umidade	41
4.6.3 Determinação de Proteínas	41

4.6.4 Teor de Lipídios	41
4.6.5 Resíduo Mineral Fixo	42
4.7 Teor Residual de Nitrito	42
4.8 AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA	42
4.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	43
4.10 ANÁLISE COLORIMÉTRICA	44
4.10.1 Análise colorimétrica de amostras comerciais e formuladas com diferentes concentrações de carmim	44
4.10.2 Análise colorimétrica durante a vida de prateleira de linguiças toscana formuladas com diferentes tratamentos e armazenadas sob refrigeração e congelamento	44
4.11 ANÁLISE SENSORIAL	45
4.11.1 Efeito da substituição total ou parcial do carmim e nitrito pelo bixinato de potássio sobre a aparência visual das linguiças	45
4.11.2 Efeito do uso do sal de bixina sobre o gosto das linguiças	46
4.12 ASPECTOS ÉTICOS	47
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Obtenção da Bixina	47
5.2 Composição química proximal da Matéria-prima e embutido cárneo frescal tipo toscana	49
5.3 Análise de Nitrito Residual durante o Armazenamento em Amostras de Linguiça Toscana.....	50
5.4 Efeito do Bixinato de Potássio sobre a Oxidação Lipídica	52
5.5 Análise colorimétrica de linguiças toscana	55
5.5.1 Efeito da adição de diferentes concentrações de carmim sobre o parâmetro a* das amostras experimentais e comerciais de linguiças toscana.....	55
5.5.2 Efeito do bixinato de potássio sobre a cor de linguiças toscana na substituição do nitrito de sódio e carmim	57

5.5.2.1 Desenvolvimento de cor vermelha (parâmetro a^*) das amostras refrigeradas de linguiça toscana	57
5.5.2.2 Desenvolvimento de cor vermelha (parâmetro a^*) de linguiças toscana armazenadas congeladas	59
5.5.2.3 Cor amarela (parâmetro b^*) de linguiças toscana armazenadas refrigeradas	60
5.5.2.4 Cor amarela (parâmetro b^*) de linguiças toscana sob congelamento ...	61
5.5.2.5 Luminosidade (parâmetro L^*) em linguiças toscana armazenadas refrigeradas	62
5.5.2.6 Luminosidade (parâmetro L^*) em linguiças toscana armazenadas congeladas	63
5.6 Análise Microbiológica das formulações de linguiça toscana	64
5.7 Efeito da substituição de carmim e nitrito de sódio por sal de bixina na análise sensorial de linguiças do tipo toscana	67
5.7.1 Efeito das diferentes concentrações de carmim sobre a aceitação sensorial de linguiças toscana	68
5.7.2 Efeito da substituição do carmim e nitrito pelo bixinato de potássio sobre a aparência visual das linguiças toscana	69
5.7.3 Efeito da substituição do carmim e nitrito pelo bixinato de potássio sobre a percepção de gosto das linguiças toscana	72
6. CONCLUSÃO	74
REFERENCIAS	75
ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

A demanda por cortes de carnes, proporcionada pelo aumento populacional e de renda, apresenta maior crescimento do que a criação de bovinos, suínos e aves no país. O Brasil está entre os principais países produtores de carne suína do mundo, em 2014 produziu 3.344 mil toneladas, sendo 89% da produção destinadas à utilização em produtos industrializados (ABPA, 2014). O processamento da carne suína envolve cozimento, defumação, salga e/ou uso de aditivos durante a produção. Os embutidos frescais destacam-se dentre os produtos cárneos, como exemplo, a linguiça toscana, um derivado composto exclusivamente de matéria prima de origem suína (BRASIL, 2000).

A qualidade dos embutidos cárneos frescais pode ser comprometida, devido ao uso inadequado de processamento térmico, manipulação da matéria-prima e elevada quantidade de lipídios (HUGO e HUGO, 2015). O uso de aditivos visa contornar e retardar os problemas decorrentes do armazenamento e processamento do produto (SATO *et al.*, 1992). Dentre os parâmetros sensoriais, a cor é um importante atributo sensorial, e alterações na aparência do produto, podem afetar a aceitação do consumidor (GLITSCH, 2000).

O nitrito é um aditivo comumente utilizado em linguiças e outros produtos cárneos, atuando como antioxidante e conservante, sobretudo, em relação ao *Clostridium botulinum*. Além das ações mencionadas, o nitrito também age como fixador de cor, prevenindo a oxidação da mioglobina e estabilizando a cor vermelha característica do produto (BENEDETTI *et al.*, 2011). No entanto, o nitrito ao reagir com aminas secundárias ou terciárias, provoca a formação das nitrosaminas e essas apresentam potencial carcinogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A adição do nitrito aos alimentos é limitada por diversas agências reguladoras internacionais. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), limita a quantidade máxima utilizada a 0,015g/100g de produto cárneo (BRASIL, 2006). Recentemente, a OMS, classificou as carnes processadas como grupo 1, sendo consideradas carcinogênicas para a população. Essa classificação está relacionada à formação de substâncias,

como os compostos N-nitrosos, durante o processamento das carnes (OMS, 2015).

Apesar do nitrito atuar como fixador de cor, o uso de corantes adicionais é comum nos produtos cárneos. A cor vermelha visualizada nas linguiças tipo Toscana é resultante também da adição do corante carmim de cochonilha. O ácido carmínico, princípio ativo do carmim, é oriundo das fêmeas de insetos do gênero *Dactylopius sp.*, extraído e purificado para posterior comercialização (BORGES *et al.*, 2012). A falta de padronização na concentração utilizada em linguiças é um dos problemas apresentados pelo uso do carmim, gerando coloração artificial no produto e afetando a aceitação dos consumidores. A obtenção do carmim no Brasil é realizada através da importação de insetos secos ou do princípio ativo, elevando os custos da indústria nacional. Embora o carmim seja reconhecido como seguro, relatos de caso sobre hipersensibilidade são encontrados na literatura, relacionando a ingestão e o contato com o corante a reações alérgicas, dependendo da sensibilidade individual (ACERO *et al.*, 1998; CHUNG *et al.*, 2001; VOLTOLINI *et al.*, 2014).

Alternativas para a substituição de aditivos com algum grau de toxicidade ou sintéticos, como o nitrito, tem sido descritas em amplo número de publicações (BOLOGNESI, 2014; BENEDETTI *et al.*, 2011; ZARRINGHALAMI *et al.*, 2009). O urucum (*Bixa orellana*), vegetal encontrado amplamente no Brasil, apresenta em sua composição, o carotenóide bixina, composto utilizado como corante laranja em diversos produtos alimentícios, como cárneos e lácteos (ROCHA GARCIA *et al.*, 2012). O uso dos derivados do urucum tem sido amplamente explorado em produtos cárneos, porém, sua característica lipofílica limita sua utilização nos alimentos. Diante do exposto, este trabalho tem por objetivo avaliar o uso do sal de bixina como substituinte do carmim de cochonilha e do nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o uso do sal de bixina como substituinte do carmim de cochonilha e do nitrito de sódio em embutidos cárneos frescais.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar os embutidos cárneos frescais quanto à composição química proximal e pH;
- ✓ Mensurar os níveis residuais de nitrito ao longo do tempo de prateleira em linguiças;
- ✓ Investigar a ação antioxidante do sal de bixina como substituto do nitrito de sódio em linguiças frescais;
- ✓ Avaliar o efeito da substituição do carmim de cochonilha pelo bixinato de potássio em relação à cor de linguiças frescais;
- ✓ Investigar a ação antimicrobiana do sal de bixina em linguiças frescais;
- ✓ Analisar o efeito do sal de bixina sobre a aceitação sensorial de linguiças frescais;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CARNES

As civilizações passadas consumiam a carne de animais selvagens ou de criação, demonstrando-se esse alimento uma importante fonte de nutrientes desde os tempos antigos. Além do tecido muscular, outras peças também são utilizadas para consumo, como os tecidos adiposo e conjuntivo, órgãos internos e sangue (BELITZ *et al.*, 2009).

As carnes e derivados são importantes fontes de proteína, gordura, aminoácidos, vitaminas e minerais. O aumento da demanda mundial, além da preocupação com a ingestão de gorduras, colesterol, nitrito e outros compostos, tem oportunizado o desenvolvimento de tecnologias e de novos derivados pela indústria cárnea (BARBUT, 2014).

As carnes são compostas por quatro tipos de tecidos, o muscular, conjuntivo, epitelial e nervoso, sendo o tecido muscular esquelético o mais utilizado para o consumo humano. O tecido muscular esquelético consiste em células longas, finas e paralelas, apresentando como unidade estrutural, as fibras musculares. Cada uma dessas fibras musculares estão organizadas pelo tecido conjuntivo em estruturas reconhecidas como endomísio, perimísio e epimísio, responsáveis por manter as fibras unidas (Figura 1). Essas fibras são constituídas de três classes de proteínas musculares, classificadas segundo sua solubilidade, sendo as solúveis em água e solução salina (Sarcoplasmáticas), solúveis em solução salina concentrada (Miofibrilares) e insolúveis (Estromáticas) (BELITZ *et al.*, 2009).

As proteínas miofibrilares são denominadas miofibrilas, cuja função é a de contração muscular. Essas são responsáveis pela organização do sarcômero, unidade básica onde ocorre a contração e relaxamento muscular. São formadas pelas proteínas actina, α e β – actinas, desmina, miosina, tropomiosina, troponina, proteínas C e M. A actina e miosina estão presentes em maior concentração nos filamentos finos e grossos, respectivamente (FENNEMA, 1996).

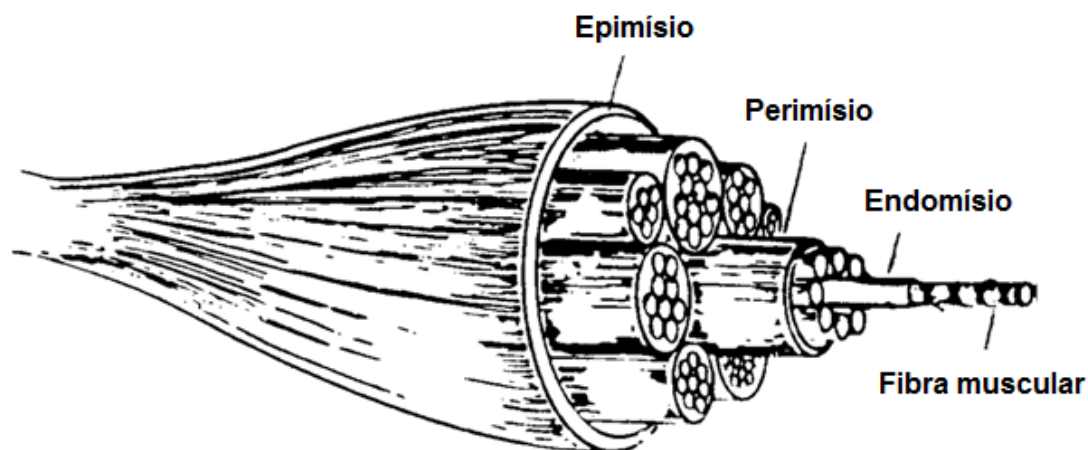


FIGURA 1 – ESTRUTURA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO. FONTE: Adaptado de BELITZ *et al.*, (2009).

Observando ao microscópio óptico, por corte longitudinal do tecido, nota-se alteração entre faixas claras e escuras. A organização da fibra muscular, ao microscópio de polarização, em banda A (anisotrópica – faixa escura) e banda I (isotrópica – faixa clara), reflete aos filamentos grossos e finos. A banda I é formada apenas por filamentos finos, a banda A por filamentos finos e grossos e a banda H somente por filamentos grossos. Essa banda H é a região mais clara no centro da banda A. A faixa escura, perpendicular ao eixo da fibra muscular e no centro da banda I denomina-se linha Z. O sarcômero estende-se de uma linha Z a outra, sendo composto de filamentos finos e grossos (BELITZ *et al.*, 2009; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004) (Figura 2).

As proteínas estromáticas correspondem a aproximadamente 15% do músculo esquelético. São conhecidas como proteínas do tecido conjuntivo, tendo, como exemplo, o colágeno e elastina, presentes em maior quantidade. Essas proteínas são responsáveis pela estruturação do músculo esquelético, sendo as menos solúveis, quando comparadas as sarcoplasmáticas. O colágeno é a proteína animal mais abundante no tecido conjuntivo, contribuindo para a resistência do tecido muscular. Está presente nos tendões, pele, ossos, sistema vascular, e compreende a 30% ou mais do total de proteínas dos mamíferos (FENNEMA, 1996).

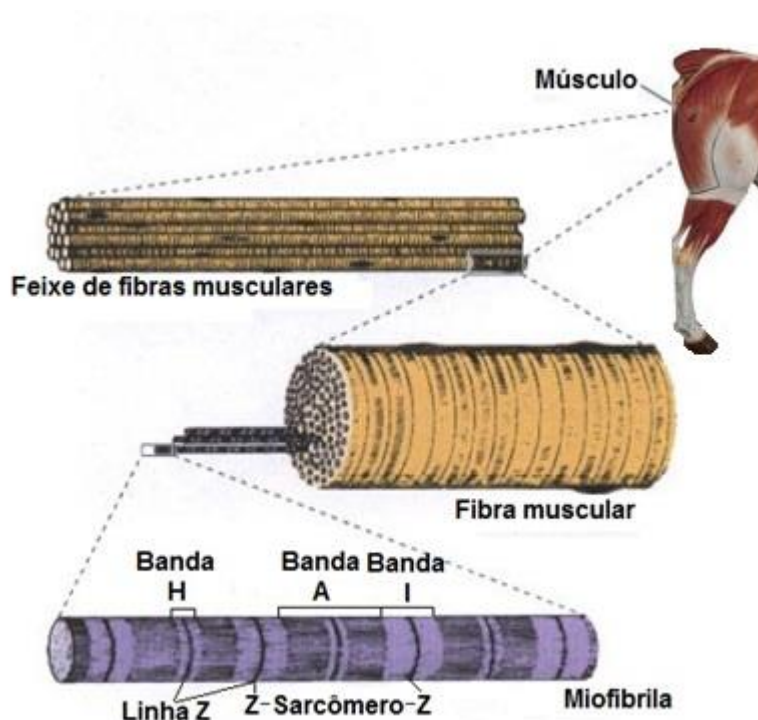


FIGURA 2 – ESQUEMATIZAÇÃO DO SISTEMA MUSCULAR. FONTE: Adaptado de JUNQUEIRA e CARNEIRO (2004).

As proteínas sarcoplasmáticas constituem aproximadamente 35% das proteínas miofibrilares, sendo a mioglobina e enzimas exemplos dessa classe. A mioglobina é um complexo de globina e grupo heme, apresentando a função de armazenamento e transporte de oxigênio. Alterações em sua estrutura, conformação e estado de oxidação promovem mudanças na coloração do tecido muscular, de vermelho a marrom. A cor das carnes frescas é determinada pela quantidade relativa de três formas de mioglobina: a desoximioglobina (Mb), a oximioglobina (MbO₂) e a metamioglobina (MetMb). A proteína em seu estado primário, Mb, confere coloração vermelho – púrpura, e quando ligada ao oxigênio (MbO₂) apresenta a cor vermelho brilhante. Caso ocorra oxidação da mioglobina, o ferro do grupamento heme passa da forma Fe⁺² para o estado férrico (Fe⁺³), conferindo cor marrom à carne (FENNEMA, 1996; BELITZ *et al.*, 2009) (Figura 3).

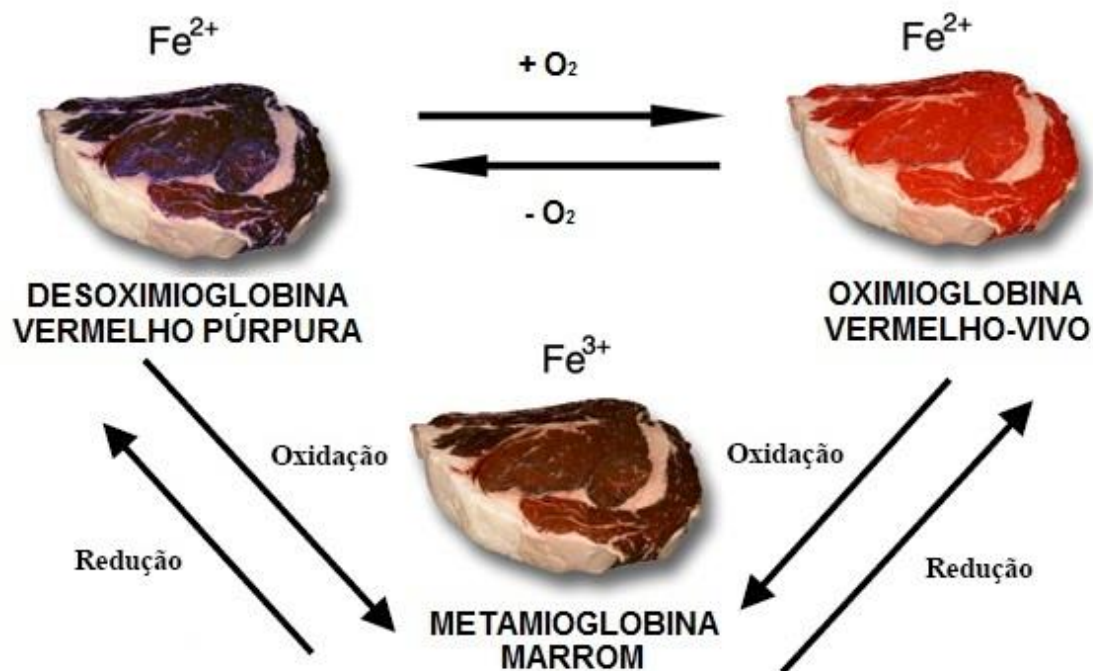


FIGURA 3 – RELAÇÃO ENTRE OS ESTADOS DE OXIDAÇÃO DA MIOGLOBINA E A COR DA CARNE. FONTE: Adaptado de PAPYRUS (2011).

3.2. EMBUTIDOS CÁRNEOS

Os embutidos cárneos são definidos pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), como o produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis, curados ou não, condimentado, podendo ou não ser cozido, defumado, dessecado, e contido em envoltório natural (BRASIL, 1952).

Entre os embutidos, as “linguiças” são definidas pela legislação brasileira como produto cárneo industrializado, produzido com carnes de animais de açougue, com presença ou não de tecido adiposo, aditivos, sendo embutido em envoltório natural ou artificial e elaboradas conforme processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000).

O preparo de linguiças pode envolver carnes de origem suína, bovina e de aves, sendo essas desossadas e trituradas para posterior mistura com

ingredientes como, sais de cura, temperos, toucinho, água, e entre outros permitidos por legislação. Após mistura, a massa é embutida em envoltório natural ou artificial, podendo ser cozida ou não, curada, maturada e dessecada (MARQUES *et al.*, 2006).

Na linguiça tipo frescal é permitida a adição de água ou gelo, correspondendo no máximo a 3% da formulação. Conforme características físico-químicas podem apresentar umidade máxima de 70%, gorduras (Máx. 30%) e proteínas (mín. 12%) (BRASIL, 2000). Ao processo agregam-se aditivos objetivando melhorar as características sensoriais do produto (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Dentre as linguiças, destaca-se a toscana (LT), um produto cárneo cru e curado obtido exclusivamente de carnes suína, com adição de gordura suína e ingredientes (BRASIL, 2000). Sua denominação de origem refere-se à região da Itália, na qual essa linguiça é produzida com carne suína, toucinho e temperos como alho e pimenta. A “salsiccia toscana”, como é reconhecida pelos italianos é um dos produtos cárneos mais apreciados naquele país (KAMDEM *et al.*, 2007). No Brasil, a vinda de imigrantes no século passado, disseminou a culinária Italiana e o consumo de linguiças toscana. Esses embutidos tem sido objeto de diversos estudos visando a redução da quantidade de NaCl, nitrito de sódio, gordura e avaliação da qualidade microbiológica (GALVAN *et al.*, 2011; BERNARDI e ROMAN, 2011; MARQUES *et al.*, 2006).

3.3. ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

Na produção de linguiças frescas não se utiliza qualquer tratamento que envolva calor com o objetivo de inativar microrganismos, em contrapartida são adicionados sais de cura, visando à estabilidade da microbiota nesse alimento (VENTURINI *et al.*, 2011). A alta atividade de água (Aa), assim como a manipulação de ingredientes são fatores de risco para contaminação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Clostridium botulinum* (BARROS *et*

al., 2002; MARQUES *et al.*, 2006). Durante o processamento e no acondicionamento do produto final há a necessidade de rigorosas análises de controle microbiológico, visando manter a qualidade do produto. Conforme Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) do MAPA n.12, regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001). Os limites estabelecidos conforme legislação são:

- ✓ Coliformes a 45°C: 5×10^3 UFC/g;
- ✓ *Estafilococos* coagulase positiva: 5×10^3 UFC/g;
- ✓ *Clostridio* sulfito redutor a 46°C: 3×10^3 UFC/g;
- ✓ *Salmonella sp.*: ausência em 25 g.

O elevado consumo de linguiças frescas, sobretudo no sul do Brasil, tem sido relacionado a infecções alimentares (SILVA *et al.*, 2004). Portanto, há necessidade de um controle higiênico-sanitário rígido durante sua produção e armazenamento (TERRA, 1998; TERRA, 2003; FORSYTHE, 2000).

Dentre os microrganismos patogênicos e deteriorantes, a *Salmonella spp.* é o principal agente associado a Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (CARDOSO e CARVALHO, 2006). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, essa bactéria é Gram-negativa, não esporogênica, anaeróbia facultativa e está presente em elevada concentração nos animais e ambiente, tendo como principais fontes a água, solo e fezes. A técnica para a detecção de *Salmonella spp.*, envolve a presença ou ausência da bactéria (SILVA *et al.*, 2007).

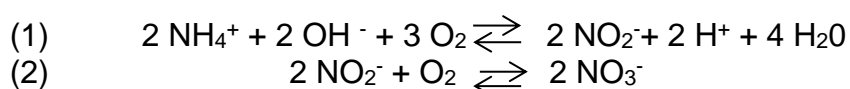
Os *Staphylococcus aureus*, são bactérias pertencente ao grupo dos cocos Gram-positivos, anaeróbicas facultativas, com maior desenvolvimento sob condições aeróbicas, e sob temperatura variando de 7°C a 47,8°C. Em relação à atividade de água, o crescimento ocorre em valores acima de 0,86 (JAY, 2005). Essa espécie de microrganismos está relacionada a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), e sua contaminação ocorre principalmente por ação do homem e condições inadequadas de higiene e processos, que resultam contaminações cruzadas por contato com equipamentos, utensílios e matéria prima (SILVA *et al.*, 2007).

A bactéria *Clostridium botulinum* é um bacilo gram positivo, produtor de esporos, e de uma potente toxina, produzida em alimentos que apresentam pH básico ou próximo a neutralidade. Entretanto, essa proteína é degradada quando exposta a aquecimento a 80°C por 30 minutos ou 100°C por 5 minutos (CUI *et al.*, 2010).

3.4. NITRATO E NITRITO DE SÓDIO

Os sais de cura, compostos pelos cloretos, nitrato e nitrito de sódio são comumente utilizados como aditivos alimentares no processamento das carnes. Além de atuarem como conservantes são fixadores de cor, apresentam atividade antioxidante e conferem sabor característico aos derivados cárneos. Nitrato e nitritos estão presentes no solo, na água, e nos vegetais, portanto, estão amplamente distribuídos em alimentos de origem animal e vegetal (ANDRADE, 2004). A promoção de cor nos produtos cárneos ocorre pela reação entre o óxido nítrico, originado da redução do nitrito, com a mioglobina, formando o composto nitrosilmioglobina que apresenta coloração rósea (FARIA *et al.*, 2001). Nos embutidos frescais curados, o nitrito atua como um agente seletivo no desenvolvimento de microrganismos. A sua presença confere proteção contra o *Clostridium botulinum*, porém é ineficaz contra enterobactérias e outras bactérias que causam a deterioração do alimento (PRICE e SCHWEIGERT, 1994).

Os nitritos são formados através de um processo de oxidação biológica (nitrificação), a partir do íon amônio, de acordo com as reações (1) e (2):



A utilização de nitrito e nitrato como conservantes é discutida mundialmente, em decorrência do uso exagerado desses aditivos e da provável toxicidade relacionada a formação de compostos N-nitrosos, denominados nitrosaminas. As nitrosaminas são formadas pela reação do nitrito com aminas

presente nos alimentos, ao sofrerem aquecimento ou na presença do pH ácido, apresentam potencial efeito carcinogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A fim de controlar a ingestão desse aditivo, a legislação brasileira estabelece limites para os níveis de nitrito utilizados em produtos cárneos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o limite máximo permitido corresponde a 0,015g/100g em embutidos frescos (BRASIL, 2006).

A Agência Europeia que regulamenta aditivos alimentares, a EFSA, estabelece limite idêntico ao proposto pela legislação brasileira (150 mg/kg). O Food and Drug Administration (FDA), órgão responsável pela atividade nos Estados Unidos, limita a adição de 200mg/kg do produto final (EFSA, 2003; FDA, 2015).

A adição de nitrito e nitrato aos alimentos vem despertando grande preocupação pela OMS (Organização Mundial de Saúde), que estabeleceu novas classificações quanto à segurança do consumo de carnes vermelhas e processadas. As carnes vermelhas foram classificadas como grupo 2, pertencente a classe de substâncias capazes de ocasionar câncer devido ao seu consumo. Por outro lado, as carnes processadas, foram enquadradas no grupo 1, caracterizado por substâncias que causam câncer, ao qual pertence o tabaco (fumo) e o amianto. Fato devido à produção de compostos N-nitrosos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, considerados carcinogênicos, durante o processamento da carne (OMS, 2015).

3.5. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídios são um dos componentes mais variáveis nas linguças, encontrando-se presente em grande percentual na composição e sendo importantes no processamento por conferir textura e características sensoriais desejáveis (BAER e DIGER, 2014).

A carne suína apresenta elevada concentração de gorduras sujeitas à reação de oxidação, catalisadas pela exposição do produto ao oxigênio,

temperatura elevadas e exposição à luz. Esse problema ocorre devido à presença relativamente elevada de ácidos graxos insaturados na carne suína (HAYES *et al.*, 2010). Dentre os diversos fatores que podem afetar o tempo de prateleira do produto, a oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos, causando o aparecimento de gostos e odores desagradáveis, além de compostos potencialmente tóxicos (NAWAR, 2000).

Os lipídios podem ser oxidados através de diferentes mecanismos: 1) Reações hidrolíticas: catalisadas por enzimas lipolíticas ou pela exposição à temperaturas elevadas e umidade, ocasionando a formação de ácidos graxos livres; 2) Oxidação enzimática: mediada por enzimas lipoxigenases que levam a formação de peróxidos e hidroperóxidos; 3) Foto-oxidação: promovida pela radiação ultravioleta na presença de fotossensibilizadores e 4) Auto-oxidação: reação com o oxigênio molecular via mecanismos autocatalíticos (RAMALHO e JORGE, 2006).

A rancidez de carnes e produtos cárneos costuma resultar no processo de auto-oxidação dos ácidos graxos insaturados, sendo os fosfolipídios da gordura da carne os constituintes mais instáveis. Esse processo tem a capacidade de ocorrer mesmo em armazenamento sob temperaturas próximas a -10°C (LAWRIE, 2005).

Na auto-oxidação, considerado o principal mecanismo de oxidação lipídica, a sequência de reações é apresentada em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 04).

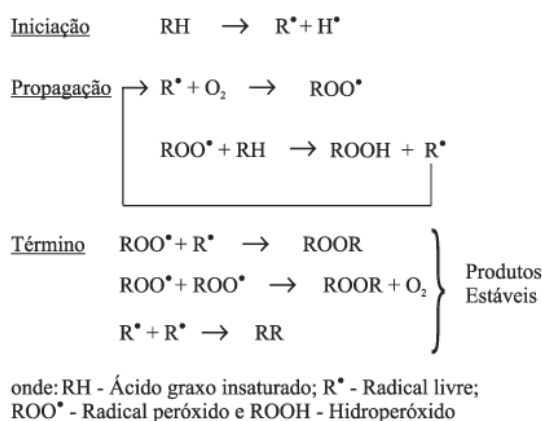


FIGURA 4 – ESQUEMA GERAL DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA. FONTE: RAMALHO e JORGE (2006).

Ácidos graxos insaturados oxidam-se na presença de luz e oxigênio ou metais, reação catalisada por íons metálicos, ainda o alto teor desses peróxidos, promove instabilidade da cor do produto final (KANNER *et al.*, 1988; PRICE e SCHWEIGERT, 1971). A presença de peróxidos, provenientes da oxidação lipídica, também pode oxidar diretamente os pigmentos da carne.

A velocidade de reação da oxidação é diretamente proporcional ao grau de insaturação da molécula de ácido graxo (ARAÚJO, 2001). A fim de se evitar a auto-oxidação de óleos e gorduras é necessário reduzir a incidência dos fatores que contribuem para a oxidação, como luz, temperatura, contato com oxigênio ou metais, impedindo a formação de radicais livres através do uso de antioxidantes (JORGE e GONÇALVES, 1998).

3.6. CORANTES

A aparência dos alimentos é um importante fator que influencia o consumidor a comprar um produto, sendo a cor dos produtos alimentícios o principal atributo visual (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Em produtos frescos, essa característica sensorial é determinante para sua aceitação, ao lado de fatores como suculência, sabor e a maciez ou textura (VENTURINI *et al.*, 2011).

Por essa razão, os corantes alimentícios são adicionados a produtos alimentícios com o objetivo de melhorar visualmente sua aceitação e restaurar as características eventualmente comprometidas durante o processamento (BONAN *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2012; SPELLMEIER e STÜLP, 2009).

3.7. CARMIM DE COCHONILHA

O carmim é um corante amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e têxtil (DAPSON, 2007; HUI, 2006; KUNKELY e VOGLER, 2011).

Nos alimentos pode ser encontrado em produtos cárneos, sucos, derivados lácteos, assim como doces e sobremesas (ARSLAN e AYCAN, 2014).

O ácido carmínico (CA) é obtido de insetos fêmeas da espécie *Dactylopius coccus* Costa, denominadas cochonilhas, por sua preferência em parasitar o vegetal *Opuntia cochinilifera* (FENNEMA, 1996). A nomenclatura oficial é ácido 7-D-glucopiranosil-9,10-dihidroxi-3,5,6,8-tetrahidroxi-1-metil-9,10-dioxi-2-antra-ceno-carboxílico, e denominação C.A.S. 1260-17-9 (Figura 05). O ácido carmínico é o constituinte principal do extrato e responsável pela coloração da cochonilha, enquanto o carmim é o corante, cuja composição consiste na associação do CA ao alumínio (DAPSON, 2007) (Figura 6). A estrutura química do ácido carmínico consiste em uma unidade de glicose acoplada em uma antraquinona e segundo o *Codex Alimentarius*, é designado internacionalmente como INS-120 (GOSETTI *et al.*, 2015; FAO, 2001).

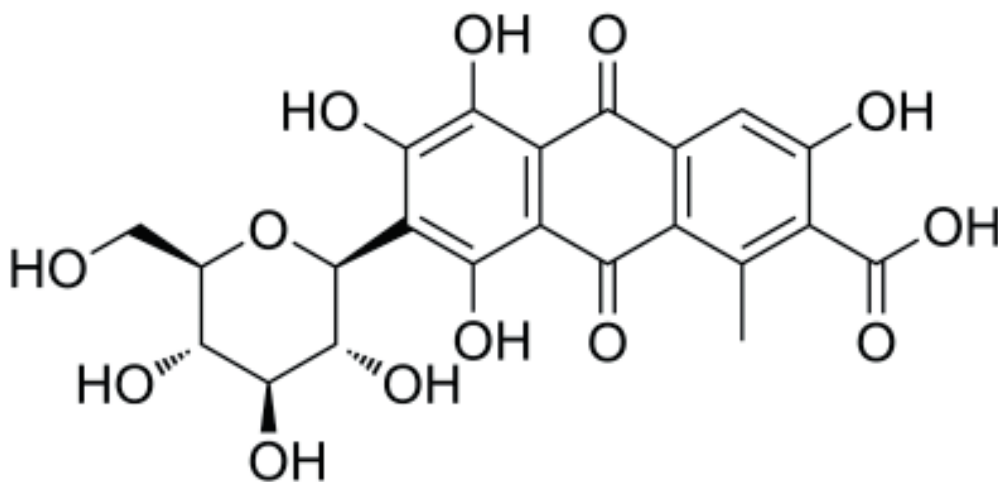


FIGURA 5 – ESTRUTURA DO ÁCIDO CARMÍNICO. FONTE: FAO (2001).

O ácido carmínico é altamente solúvel em água, estável frente a processos oxidativos, luz e aquecimento até aproximadamente 80°C, pois, se exposto a temperaturas superiores a mencionada e por tempo acima de 60 minutos pode ter sua estrutura alterada (GONZÁLEZ *et al.*, 2002; GONZÁLEZ *et al.*, 2010). O pH da solução influencia a coloração do pigmento, em valores

abaixo de 4,0 apresenta cor vermelho-magenta, no entanto, em pH superior a 6,0 prevalece o vermelho-azulado (HUI, 2006).

Além da função corante, postula-se que o ácido carmínico possa atuar como antioxidante. Segundo Gonzalez *et al.* (2010), o pigmento apresentou efeito protetor frente à oxidação do β -caroteno exercendo atividade similar a padrões comumente utilizados, como quercetina, ácido ascórbico ou trolox. Entretanto, quando adicionado como corante em embutido cárneo fermentado, na concentração de 200 ppm, exibiu reduzida capacidade antioxidante quando comparado a tratamentos alternativos, como concentrado de cenoura (EKICI *et al.*, 2015).

O processamento do corante envolve a coleta de insetos fêmeas ao atingirem a maturidade sexual, entre 90 a 110 dias de vida, período em que o ácido carmínico está presente em maior concentração (LLOYD, 1980; BARANYOVITS, 1978). A extração tradicional consistia em triturar os insetos desidratados ao sol e posterior extração em água quente, seguida da purificação do ácido carmínico. Esse processo envolvia elevado tempo de produção, reduzida seletividade e eficiência de extração, obtendo um produto de baixa qualidade. Atualmente a produção industrial consiste na extração com solventes orgânicos e hidróxidos, seguido de processos que envolvem separação e purificação do ácido carmínico para comercialização (BORGES *et al.*, 2012). Para a produção de aproximadamente 400 gramas de ácido carmínico são necessários aproximadamente 70 mil insetos (BERDANIER, 2008) (Figura 6).

esse aditivo pode provocar reações alérgicas em alguns indivíduos (FAO, 2001). Na legislação brasileira o uso do carmim, como corante, é permitido em quantidades variáveis segundo a classe do produto. Em alimentos de origem animal, a concentração máxima permitida é de aproximadamente 0,01% da formulação (BRASIL, 2006).

A toxicidade do carmim foi avaliada, entretanto, não se observaram efeitos tóxicos quando administrado em ratos utilizando-se dosagens entre 50 e 1000 mg/kg corpóreo (GRANT *et al.*, 1987; FORD *et al.*, 1987; MORI *et al.*, 1991). Apesar de não demonstrar efeitos tóxicos severos, o JECFA relata que o consumo do aditivo pode provocar reações alérgicas, dependendo da sensibilidade individual (FAO, 2001). Estudos demonstraram reações de hipersensibilidade promovidas pela ingestão e contato do carmim com a pele (ACERO *et al.*, 1998; CHUNG *et al.*, 2001; VOLTOLINI *et al.*, 2014). Em estudo de 2009, pesquisadores identificaram uma proteína denominada CC38K, decorrente do inseto de origem, como responsável por causar reações alérgicas (OHGIYA *et al.*, 2009).

3.8. URUCUM

O urucum (*Bixa orellana*), pertencente à família Bixaceae, é um vegetal nativo das Américas Central e do Sul. A árvore apresenta pequeno porte, com folhagens alcançando em média de três a cinco metros de altura, frutos em forma de cápsula deiscente (cachopas), coberta de apêndices flexíveis e apresentando internamente sementes, as quais contêm os pigmentos do urucum (COSTA, 2007).

O Brasil é o principal produtor e exportador de sementes e extratos do urucum, utilizados comumente na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001). Na indústria de alimentos, corresponde a aproximadamente 90% do consumo total de corantes naturais no Brasil (CANTO *et al.*, 1991). Um dos pigmentos extraídos das sementes é a

bixina, substância presente em elevada concentração, correspondendo a cerca de 80% dos carotenóides do urucum (SATYANARAYANA *et al.*, 2003).

A bixina (Figura 7) se encontra principalmente na configuração 9-cis, e uma pequena porção na forma de trans. Sob determinadas condições de temperatura e pH, a bixina pode ser hidrolisada em norbixina (Figura 8) e o ácido dicarboxílico é saponificado no sal de norbixina. As duplas ligações presentes na molécula constituem o grupo cromóforo, responsável pela cor vermelha da bixina. Alterações na cor estão relacionadas a modificações estruturais ou degradação da molécula (BITTENCOURT *et al.*, 2005).

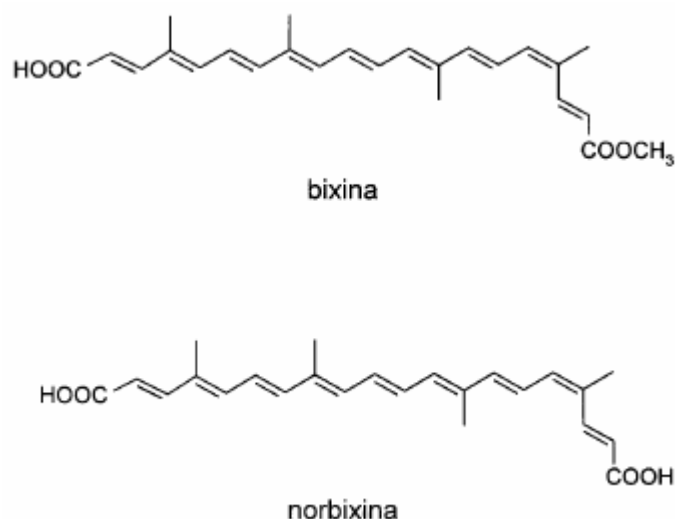


FIGURA 7 – ESTRUTURAS DA BIXINA E NORBIXINA. FONTE: ROCHA GARCIA *et al.* (2012).

Dentre as principais propriedades da bixina pode-se destacar a sua lipossolubilidade. Apresenta ponto de fusão a 198°C, coloração amarela em extrato diluído e vermelha escura em extrato concentrado, instável a luz e temperaturas acima de 75°C (ALVES, 2005). Em estudo para avaliar degradações térmicas da bixina, por espectrometria de massas de íons secundários por tempo de voo (TOF-SIMS), observou-se que quando exposta a temperaturas próximas a 100°C, inicia-se a degradação da molécula e posterior fragmentação acima de 120°C (BITTENCOURT *et al.*, 2005).

Atualmente existem diversos métodos de extração descritos em literatura, visando à obtenção de maior quantidade dos pigmentos do urucum. Pode-se citar processos mecânicos através do atrito e raspagem das sementes ou ainda por métodos físico-químicos, através de solventes. A extração pode ocorrer com óleo vegetal ou por solventes orgânicos como clorofórmio, etanol, acetona, acetato de etila (COSTA e CHAVES, 2005). A extração com solventes orgânicos prioriza a bixina, na exposição das sementes a soluções alcalinas extrai-se a norbixina (ALVES *et al.*, 2008).

Preston e Rickard (1980) relataram a extração de bixina por dois métodos: bixina solúvel em óleo e suspensão em óleo, sendo a suspensão obtida por três formas, extração por raspagem do pericarpo e posterior solubilidade em óleo, por utilização de solventes (acetona, diclorometano, etanol, e pela utilização de mono e diglicerídeos (propilenoglicol). Conforme o método empregado, pode-se obter maior quantidade do isômero cis-bixina ou da trans-bixina.

Em estudo avaliando precipitação ácida com ácido cítrico, seguida do uso de duas soluções extratoras KOH 0,1N e NH₄OH 0,52N para extração de pigmentos do urucum, verificou-se que o hidróxido de amônio apresentou o melhor rendimento para obtenção dos pigmentos. A metodologia descrita foi utilizada para a obtenção de corante na forma de pasta e pó (PIMENTEL e STRINGHETA, 1997).

Rios e Mercadante (2004) desenvolveram padrões de bixina e norbixina, com o intuito de verificar o efeito de diferentes condições de extração de bixina em “snacks” extrusados. Na obtenção do padrão de bixina, foram realizadas seguidas lavagens com solventes de polaridades diferentes (hexano, metanol e acetato de etila) e posterior cristalização com diclorometano/etanol absoluto (1:4).

A atividade antioxidante, dos compostos do urucum, tem sido relatada em alguns estudos (HAILA *et al.*, 1996; KIOKIAS e OREOPOULOU, 2006; CASTRO, MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2011). Haila *et al.* (1996), verificaram diferentes substâncias, entre elas a bixina, que apresentou destacado efeito antioxidante, reduzindo a formação de peróxido em triacilglicerídeos oxidados pela luz.

Estudos que avaliam a toxicidade de extratos de urucum têm sido desenvolvidos para atestar sua inocuidade. Quantidades de até 500 mg/kg de massa corporal por dia foram introduzidas em estômagos de ratas grávidas, para verificar os efeitos nas mães e nos fetos. Não se observaram alterações ou efeitos adversos em nenhum dos grupos, demonstrando sua inocuidade (PAUMGARTTEN *et al.*, 2002). Estudo conduzido por LIMA *et al.* (2003), utilizando extratos do urucum na alimentação de ratos, em determinadas concentrações, não demonstrou atividade mutagênica ou antimutagênica nas células da medula dos animais em estudo. A administração de doses elevada de extratos de urucum (200 mg/kg) não observou qualquer potencial hepatocarcinogênico em ratos, e quando comparada à dose diária recomendada, indica que não há potencial de danos ao fígado para o homem (HAGIWARA *et al.*, 2003).

4. MATERIAL E METODOS

4.1. Coleta

Os frutos de Urucum (*Bixa orellana* L.) foram coletados na estação experimental do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), situado na Rodovia Miguel Buffara, km 8, CEP 83350 000, município de Morretes - Paraná, coordenadas: 25°30'36.4"S/48°48'38.4"W, telefone / Fax: +55 (41) 3462-1203, no mês de julho de 2015.

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo Herbário do Departamento de Botânica, da Universidade Federal do Paraná, no qual depositou-se a exsicata sob número 83772.

4.2. Obtenção da Bixina

As sementes foram retiradas das cachopas e desidratadas em estufa de convecção regulada a 50°C até peso constante, sendo obtido aproximadamente 2,1 Kg de produto seco. Posteriormente, o material foi triturado em moinho para prover aumento da superfície de contato com o solvente extrator.

A extração da bixina foi realizada conforme metodologia descrita por Rios e Mercadante (2004), utilizando baixas temperaturas, e diferentes solventes para a remoção de substâncias oleosas e obtenção do carotenóide bixina mediante análise de pureza por CLAE. As condições utilizadas para a determinação foram: Coluna C18 (MARCA), Fase Móvel: Acetonitrila (J. T. BAKER®, EUA) / ácido acético (SIGMA=ALDRICH®, EUA) 2%, e fluxo a 0,8 mL/min. (SCOTTER *et al.*, 1994).

4.3. Síntese do Bixinato de potássio

Em béqueres de 250 mL, os cristais de bixina obtidos foram homogeneizados em solução de KOH, sob agitação, na proporção de 1mol de bixina para 1 mol de KOH, até a formação de solução apresentando cor vermelha.

4.4. Estudo preliminar para a definição da concentração de carmim a ser adicionada aos tratamentos

Foram desenvolvidas formulações com diferentes concentrações do corante carmim de cochonilha (10, 20, 30 e 40 ppm), com o intuito de verificar a intensidade de cor vermelha da linguiça preferida pelos consumidores (FIGURA 10). Para essa análise foi utilizado o teste de ordenação de preferência, comparando quatro amostras quanto à aceitação da cor vermelha. O julgador visualizou amostras frescas codificadas e utilizando um ficha de avaliação as ordenou em ordem crescente de preferência pela cor vermelha, de 1(menor

preferência) a 4 (maior preferência) (Anexo 01). O resultado foi analisado de acordo com a tabela de Newel e McFarlane a 5% de significância.

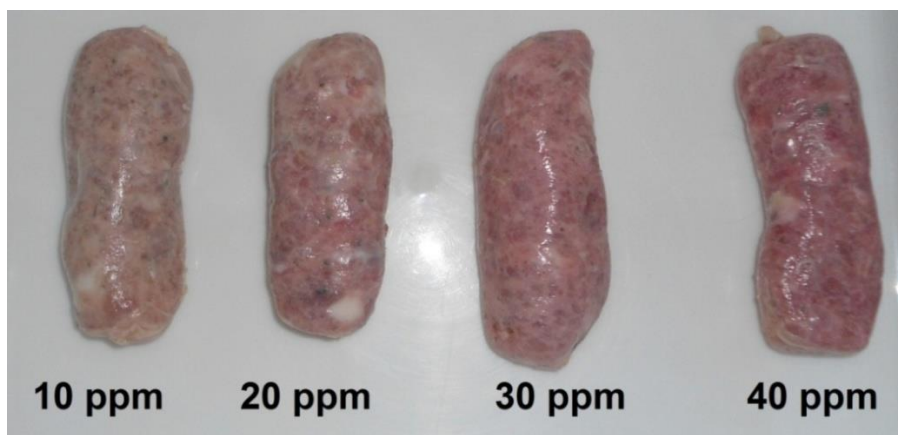


FIGURA 8 – AMOSTRAS DE LINGÜIÇA TOSCANA FORMULADAS COM CONCENTRAÇÕES DE CARMIM DE COCHONILHA ENTRE 10 E 40 PPM. FONTE: O Autor (2016).

Posterior a escolha dos julgadores foi realizado novo teste em que as duas amostras de coloração preferida pelos consumidores foram comparadas a três marcas comerciais de linguiças tipo Toscana comumente comercializadas em pontos de varejo da cidade de Curitiba-PR, para verificar se a amostra de concentração conhecida de carmim aproxima-se da aceitação das amostras comerciais (FIGURA 11) (ANEXO2). A concentração de carmim identificada como a mais aceita pelos provadores foi utilizada para elaboração das amostras de linguiça desenvolvidas nesse experimento.



FIGURA 9 – AMOSTRAS COMERCIAIS DE LINGÜIÇA TOSCANA. FONTE: O Autor (2016).

4.5. Preparo de amostras de linguiças toscana

As amostras de linguiça toscana foram formuladas segundo adaptações de TERRA (1998) (Tabela 1). Foram utilizadas como matérias-primas (MP), pernil e toucinho suínos adquiridos em açougue da região de Curitiba-PR e mantidas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$), até o processamento, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná. Realizou-se a limpeza das peças de pernil suíno e toucinho para posterior moagem em moedor industrial CAF-5, utilizando disco de 10 mm.

Tabela 1 – FORMULAÇÃO BASE PARA O PREPARO DOS TRATAMENTOS DE LINGUIÇAS TOSCANA.

Matéria-prima e ingredientes	Porcentagem (%)
Pernil suíno	79,92
Toucinho	17,54
Água	3,0
Sal (NaCl) (CRISTAL®)	1,36
Alho moído seco	0,39
Pimenta branca seca	0,19
Manjerona seca	0,19
Tripolifosfato de sódio (SYNTH®)	0,24
Glutamato monossódico (AJINOMOTO®)	0,15

FONTE: Adaptado de Terra (1998).

Após moagem e mistura dos ingredientes, a massa foi embutida manualmente em envoltório natural suíno, previamente higienizado em água corrente e hidratado na presença de água/ácido acético (90:10). As formulações desenvolvidas foram acondicionadas em embalagens plásticas seladas sem vácuo, identificadas e armazenadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 1$) e congelamento ($-15^{\circ}\text{C}\pm 1$) para as respectivas análises (FIGURA 9).

O tratamento controle (CT) foi formulado segundo a composição base de matéria-prima e ingredientes. As formulações teste, além da composição base, foram acrescidas dos seguintes aditivos: Carmim (CAR) foi adicionado 40 ppm de carmim de cochonilha (3%) (CORANTEC®), a formulação carmim/nitrito (C/N), 40 ppm de carmim, porém acrescido de 150 ppm de nitrito de sódio P.A. (VETEC, RJ, BRASIL) e o tratamento NIT contendo 150 ppm de nitrito de sódio

(NIT). Para os tratamentos com acréscimo de bixina, no C/N/B foi reduzida à metade as quantidades de carmim e nitrito, e adicionadas 250 ppm de bixinato de potássio, visando uma substituição parcial dos aditivos, ao contrário do tratamento BIX, o qual apresentou somente o sal de bixina em sua composição (500 ppm) (TABELA 2).

TABELA 2 – ADITIVOS E SUAS QUANTIDADES ADICIONADAS AOS TRATAMENTOS DE LINGUIÇAS TOSCANA

Tratamentos	Concentração Carmim (ppm)	Concentração Nitrito de sódio (ppm)	Concentração Bixinato de potássio (ppm)
Controle (CT)	0	0	0
Carmim (CAR)	40	0	0
Nitrito (NIT)	0	150	0
Carmim/Nitrito (C/N)	40	150	0
Carmim/Nitrito/Bixinato de potássio (C/N/B)	20	75	250
Bixinato de potássio (BIX)	0	0	500

FONTE: O Autor (2016).

Além dos tratamentos descritos na TABELA 2 acima, foi desenvolvida uma formulação Integral (INT), contendo concentração idêntica a formulação C/N (40 ppm de carmim e 150 ppm de nitrito de sódio), porém, com adição do Bixinato de potássio (500 ppm). O tratamento foi preparado exclusivamente para teste sensorial triangular e de ordenação de preferência (Item 4.10).

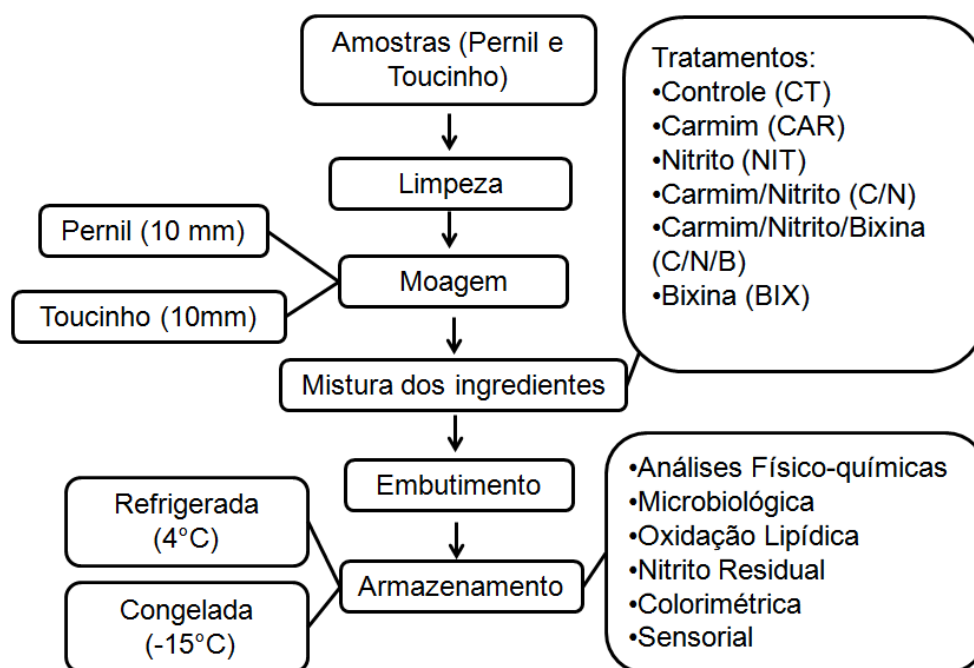


FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE PREPARO DAS FORMULAÇÕES DE LINGUIÇAS TIPO TOSCANA. FONTE: O AUTOR (2016).

4.6. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA PRIMA E EMBUTIDO FRESCAL TIPO TOSCANA

4.6.1. Determinação de pH

O pH do pernil suíno foi determinado em sextuplicatas, sob temperatura ambiente, utilizando um potenciômetro (MS TECNOPON, SP, Brasil), dotado de sonda, previamente calibrado em soluções tampão de pH 4, 0 e 7,0.

4.6.2. Umidade

A umidade das matérias-primas e da lingüiça processada foi determinada utilizando estufa a 105°C até peso constante das amostras (IAL, 2008).

4.6.3. Determinação de Proteínas (Método de Kjeldahl)

A concentração de proteínas da MP e das linguiças processadas foi determinada segundo o método de Kjeldahl, utilizando bloco digestor de proteínas (SOLAB SL, Brasil) e destilador de nitrogênio (MARCONI MA 036, Brasil). Para o cálculo da concentração de proteínas utilizou-se o fator 6,25 para conversão do nitrogênio (IAL, 2008).

4.6.4. Teor de Lipídios

A determinação de lipídios da MP e linguiças processadas CT, previamente desidratados, foi realizada utilizando extração em aparelho de Soxhlet, durante 4 horas, utilizando-se éter de petróleo como solvente. O conteúdo lipídico das

amostras retido no balão volumétrico foi determinado pela diferença de peso (IAL, 2008).

4.6.5. Resíduo mineral fixo

A determinação de resíduo mineral fixo da MP e CT foi realizado através de incineração da amostra em mufla a temperatura de 540-550°C, segundo método descrito em IAL (2008).

4.7. TEOR RESIDUAL DE NITRITO

As amostras de linguiça toscana foram homogeneizadas com auxílio de bastão de vidro e aproximadamente 10 gramas foram tomadas e adicionadas de 5 mL de tetraborato de sódio e 50 mL de água destilada aquecida a 80°C. Após 15 minutos em banho maria ($80\pm 1^\circ\text{C}$), foram transferidas para balão volumétrico e adicionadas de 5 mL de acetato de zinco e 5 mL de ferrocianeto de potássio, sob agitação a cada adição de reagente. Foi completado o volume para 250 mL com água destilada, e as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos. Após filtração das amostras, 10 mL foi recolhido e adicionado 3 mL de alfa-naftiletilenodiamina (0,5%) e sulfanilamida (0,5%) em meio ácido (ácido clorídrico 18,5%) para o desenvolvimento de cor e mensuração em espectrofotômetro a 540 nm. Os cálculos e concentração de nitrito foram determinados por meio de curva padrão prestabelecida, utilizando concentrações da solução padrão de nitrito (8 µg/mL a 56 µg/mL) (IAL, 2008).

4.8. AVALIAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A análise da oxidação lipídica na MP e amostras de linguiça toscana, foi realizada segundo a determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), utilizando método proposto por Tarladgis, Pearson e Dugan (1964) e modificado por Torres *et al.* (1989). A leitura ocorreu em espectrofotômetro à 532 nm, analisando o complexo de coloração rósea formado pela condensação de dois moles do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (J. T. BAKER, PA, EUA) com substâncias reativas a este composto.

Pesaram-se 10 g de amostra previamente moídas, as quais foram adicionados 96 mL de água destilada, 2 mL de ácido clorídrico 4M e 2mL de sulfanilamida, sendo acrescentado ainda 2 gotas de solução anti-espumante e pérolas de vidro. Em seguida a solução foi destilada utilizando aparelho de destilação de Friedrich modificado e chapa aquecedora, durante 20 minutos, sendo coletados 50 mL em erlenmeyer de 125 mL. Para cada tratamento a destilação foi realizada em triplicata, sendo recolhido 5 mL do destilado em tubo de ensaio, seguido de adição de 5 mL de TBA 0,02 M, e aquecimento em banho-maria ($95\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 35 minutos, resfriado a temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro a 532 nm. As análises referidas ocorreram nos dias 0, 5, 10 e 15 para amostras refrigeradas e nos dias 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90 para as congeladas.

As leituras obtidas foram transformadas em concentração mol de TBARS por meio da equação de reta da curva previamente estabelecidas e então multiplicadas pelo fator 6,61, determinado experimentalmente e expressos em mg de TBARS/Kg de produto.

4.9. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras dos tratamentos teste em duas condições de armazenamento: refrigeradas (4°C) e congeladas (-15°C). Nas amostras refrigeradas, as análises ocorreram nos dias 0, 7 e 14, enquanto nas congeladas nos dias 0, 30 e 60. Além das amostras testes, o tratamento integral, desenvolvido exclusivamente para análise

sensorial, também foi avaliado. As análises foram realizadas para os parâmetros microbiológicos preconizados na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, correspondendo ao teste com os microrganismos NMP para Coliformes termotolerantes (Técnica Número Mais Provável), *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor e *Salmonella* (BRASIL, 2001). Apesar de a legislação exigir apenas determinação dos microrganismos citados acima, realizou-se também a contagem para microrganismos mesófilos, bolores e leveduras (SILVA *et al.*, 2007; BRASIL, 2003).

4.10. ANÁLISE COLORIMÉTRICA

A análise colorimétrica foi realizada utilizando espectrofotômetro portátil, colorímetro (HUNTER LAB®) miniscan XE PLUS e as coordenadas do sistema L*, a*, b*. Os valores de luminosidade (L*), componente vermelho-verde (a*) e componente azul-amarelo (b*) foram expressos no sistema de cor CIELAB. As análises ocorreram na Central Analítica do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

4.10.1. Análise colorimétrica de amostras comerciais e formuladas com diferentes concentrações de carmim

Realizou-se a análise instrumental de cor de amostras desenvolvidas com diferentes concentrações de carmim (10, 20, 30 e 40 ppm) sem adição de nitrito de sódio e de amostras comerciais de adquiridas em varejo, na forma frescal.

4.10.2. Análise colorimétrica durante a vida de prateleira de linguiças toscana formuladas com diferentes tratamentos e armazenadas sob refrigeração e congelamento

Foram obtidas as leituras dos tratamentos testes (CT, CAR, NIT, C/N, C/N/B e BIX) em sextuplicatas, na forma crua e após tratamento térmico. Nas

amostras de linguiça toscana refrigeradas, as leituras foram realizadas nos dias 0, 5, 10 e 15, e nas amostras congeladas, 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento.

4.11. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial das formulações de linguiça toscana foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, do Departamento de Farmácia da UFPR. Anterior as análises, o trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UFPR. As amostras previamente codificadas e expostas em pratos plásticos brancos foram avaliadas por 40 provadores nos testes de avaliação visual e 50 provadores nos testes de degustação, ambos não treinados. A avaliação visual pelos os provadores foram referentes a amostras cruas ou frescas e assadas, e para o teste de paladar somente amostras assadas. O processamento térmico das amostras ocorreu em forno, aquecido a 270°C pelo período de 30 a 40 minutos, até alcançar temperatura interna de 75°C, sendo servidas para degustação a 45°C.

4.11.1 Efeito da substituição total ou parcial do carmim e nitrito de sódio pelo bixinato de potássio sobre a aparência visual das linguiças

Amostras frescas e congeladas dos tratamentos citados na TABELA 2 foram avaliadas visualmente, na forma crua e assada, quanto à preferência pela cor (ANEXOS 3 e 4). Os testes foram realizados nos dias 0, 5, 10, para amostras refrigeradas, e 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento para amostras congeladas.

4.11.2 Efeito do uso do sal de bixina sobre o gosto das linguças

Na análise sensorial de gosto, foram avaliados dois tratamentos: Formulação Comercial (40 ppm de Carmim + 150 ppm de nitrito) e outra amostra de igual formulação, porém com adição de 500 ppm de bixina (INT) (ITEM, 4.4). Os tratamentos INT e C/N foram analisados quanto à percepção do gosto, utilizando os testes triangular e de ordenação de preferência. O teste triangular teve como objetivo verificar se o julgador poderia detectar pequenas diferenças quanto ao gosto entre os tratamentos, consistindo na apresentação de duas amostras idênticas e uma diferente, devendo o provador identificar em ficha própria, amostra diferente (ANEXO 5) (IAL, 2008). Posteriormente, foi realizado teste de preferência, com objetivo de identificar se existindo eventual diferença entre o gosto proporcionado pelo tratamento com bixina, esse apresentaria efeito positivo sobre a percepção dos provadores (ANEXO 6). As análises foram realizadas em cabine individual dotada de luz vermelha, para que os julgadores não fossem influenciados pela cor dos tratamentos (Figura 12).



FIGURA 11 – ANÁLISE SENSORIAL TRIANGULAR E DE ORDENAÇÃO DE PREFERÊNCIA SOB LUZ VERMELHA. FONTE: O Autor (2016).

4.12 ASPECTOS ÉTICOS

A realização da análise sensorial exigiu que cada participante assinasse um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) possibilitando-o a participar da pesquisa, o qual apresentava todas as informações sobre o trabalho (ANEXO 7). A realização desse trabalho foi precedida de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR, sendo registrado sob número CAAE 46175515.1.0000.0102.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e comparação de médias utilizando o teste Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando programa STATISTICA 8.0 (STATSOFT, 2007).

Os resultados das análises sensoriais foram verificados quanto à significância de 5% de acordo com as tabelas de Newel e McFarlane, para ordenação e 1% para o teste triangular.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção da bixina

O processo de extração, baseado nos estudos de Rios e Mercadante (2004), objetivou obter um extrato purificado de bixina a partir de sementes de urucum. A análise por CLAE resultou em picos registrados a 12 e 26 minutos, aproximadamente, nomeados como picos 1 e 2 na Figura 13. O não surgimento de outros picos demonstra a presença de somente dois carotenóides.

Rios e Mercadante (2004), utilizando as mesmas condições de extração que as do presente trabalho, descreveram para seu extrato de urucum um pico de norbixina a 7,5 min. e bixina a 20,1 minutos. Resultados similares foram observados por Scotter *et al.* (1994) avaliando extratos purificados de urucum, com pico de norbixina a 10 min. e bixina a 21,8 min. Enquanto que Tocchini e Mercadante (2001) ao analisar coloríficos de diferentes marcas comerciais, descreveram, 10 min. para norbixina e 20 min. para bixina. A diferença no tempo de retenção encontrada no presente trabalho se deve à velocidade do fluxo utilizada (0,8 mL/min.), que resultou inclusive no encaudamento do pico 2. Contudo, a semelhança do cromatograma obtido com os resultados de Scotter *et al.* (1994), Tocchini e Mercadante (2001) e Rios e Mercadante (2004), permite a identificação dos picos 1 e 2 como norbixina e bixina, respectivamente.

As condições de extração do presente estudo, como a remoção de lipídios por éter etílico, utilização de acetato de etila como solvente de extração, e, finalmente, a cristalização, resultou em extrato com 98,7% bixina e 1,3% norbixina. O grau de pureza obtido nesse extrato era esperado, uma vez que estudos de Rios e Mercadante (2004) reportaram pureza entre 94-98%. Escolheu-se como solvente o acetato de etila por esse apresentar maior rendimento (SCOTTER *et al.*, 1994; CHISTÉ *et al.*, 2011; YOLMEH *et al.*, 2014).

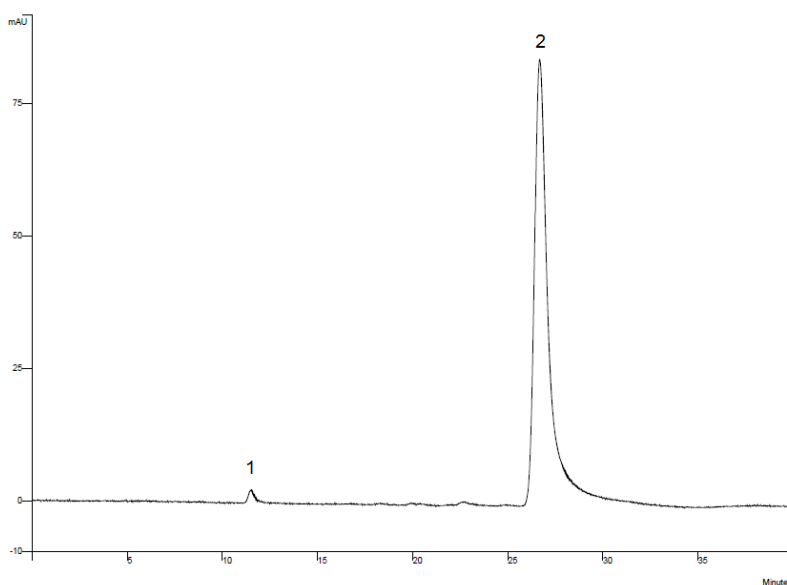


FIGURA 12 – CROMATOGRAMA, OBTIDO POR CLAE, DOS CAROTENÓIDES NORBIXINA (1) E BIXINA (2). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: COLUNA C-18, COM FASE MÓVEL ACETONITRILA/ÁCIDO ACÉTICO 2% (65:35), FLUXO A 0,8 ML/MIN. FONTE: O Autor (2015).

5.2. Composição química proximal da matéria-prima e embutido cárneo fresco tipo toscana

Os resultados da composição química proximal das matérias primas e linguiça fresca podem ser visualizados na Tabela 3. O pH do pernil, utilizado como matéria-prima, apresentou-se ligeiramente reduzido (5,45), o qual após o abate comumente alcança pH entre 5,8-6,0 (MAGANHINI et al., 2007). Esse tipo de carne é indicado para o processamento de produtos fermentados e emulsionados, porém não recomendados para produtos cozidos (WIRTH, 1986).

A linguiça toscana, ao apresentar pH 6,02, evidencia a ação do tripolifosfato. Esse aditivo apresenta grupos aniônicos de fósforo que atuam como captadores de hidrogênio, elevando o pH e deslocando o ponto isoelétrico da proteína cárnea, resultando assim em maior capacidade de retenção de água e rendimento do produto final. Os tripolifosfatos, quando adicionados em concentrações menores que 0,5%, conseguem aumentar o pH da carne de 0,2 a 0,5 unidades, tornando-se de grande aplicação na indústria (BENDALL, 1972).

Os valores de umidade (74,05%/MP e 57,13%/MT), lipídios (1,02%/MP e 28,17%/MT), proteínas (18,75%/MP e 8,42%/MT) e minerais (1,56%/MP e 1,79%/MT) do pernil e toucinho respectivamente apresentaram valores semelhantes ao observado em outros experimentos. Hautrive *et al.* (2012) descreveu, para pernil suíno, 74,96%, 21,32% e 1,27%, 1,10% para umidade, proteína, lipídios e cinzas, respectivamente. A concentração lipídica da gordura subcutânea retirada de amostras de *Longissimus dorsi*, avaliada por Abreu *et al.* (2014), apresentou concentrações entre 41,85% a 50,88%. No trabalho de Lira *et al.* (2001) o músculo pernil suíno apresentou umidade de 73,1% e 4,3% de lipídios.

A composição da linguiça toscana (LT) corrobora com o observado por Ferreira *et al.*, (2009), em que linguiças elaboradas com concentrado proteico de soro apresentaram umidade entre 62,8 a 66,7%, e gorduras totais entre 12,73-22,16%. Linguiças frescas elaboradas com lombo proveniente de suínos com diferentes dietas apresentaram umidade entre 70,61% a 71,81% (PACHECO *et*

al., 2012). A avaliação centesimal de linguiças coloniais de diferentes produtores demonstrou, em média, 24% de proteínas e teor lipídico entre 10,97% a 22,65% (SIMÕES *et al.*, 2009). Diferentes cortes comerciais, matérias-primas e também ingredientes utilizados na elaboração do produto cárneo, resultam em diferentes composições do produto final. No entanto, o produto cárneo produzido no presente trabalho se adequa aos padrões comumente observados na literatura e preconizados pela legislação, que limita para linguiças tipo toscana, umidade máxima de 70% e lipídios em 30% (BRASIL, 2006).

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA PROXIMAL E pH DAS MATÉRIAS-PRIMAS E LINGUIÇA TOSCANA.

	MP** (%)	MT** (%)	LT** (%)
pH	5,45±0,05	6,08±0,03	6,02±0,06
Umidade	74,05±0,47	57,13±0,99	70,10±0,57
Lipídios	1,02±0,41	28,17±3,95	2,30±0,25
Proteína	18,75±0,44	8,42±1,03	16,36±0,53
Cinzas	1,56±0,30	1,79±0,45	1,80±0,26

*Valores apresentados como média ± desvio padrão. MP**: Pernil suíno, MT: toucinho, LT: Linguiça Toscana.

5.3. Análise de nitrito residual durante o armazenamento de amostras de linguiça toscana

O nitrito adicionado aos produtos pode ser identificado parcialmente, pois ao combinar-se com pigmentos e matéria-prima, há uma redução da concentração disponível para detecção. A partir da concentração de nitrito de sódio inicial de 150 e 75 ppm nos tratamentos NIT, C/N e C/N/B, respectivamente, foi detectado a redução desse aditivo ao longo do tempo de armazenamento das amostras refrigeradas. Aos 5 dias de armazenamento, os tratamentos NIT e C/N, apresentaram valores reduzidos a aproximadamente 20 ppm, sendo limitados a menos de 2 ppm ao 10º dia de vida de prateleira. As amostras congeladas, de todos os tratamentos não apresentaram quantidade significativa de nitrito residual, apresentando valores próximos a 1ppm após o trigésimo dia.

O decaimento observado corrobora com resultados obtidos por Hospital *et al.* (2015) em salames, encontrando 30% a menos do valor inicial adicionado ao produto, durante 27 dias de maturação. Cassens (1990) e Honikel (2008) reportaram valores de nitrito residual variando de 5 a 20% a menos da quantidade inicial adicionada em produtos cárneos. O teor de nitrito residual encontrado no produto, não reflete necessariamente a quantidade inicial adicionada (EFSA, 2003).

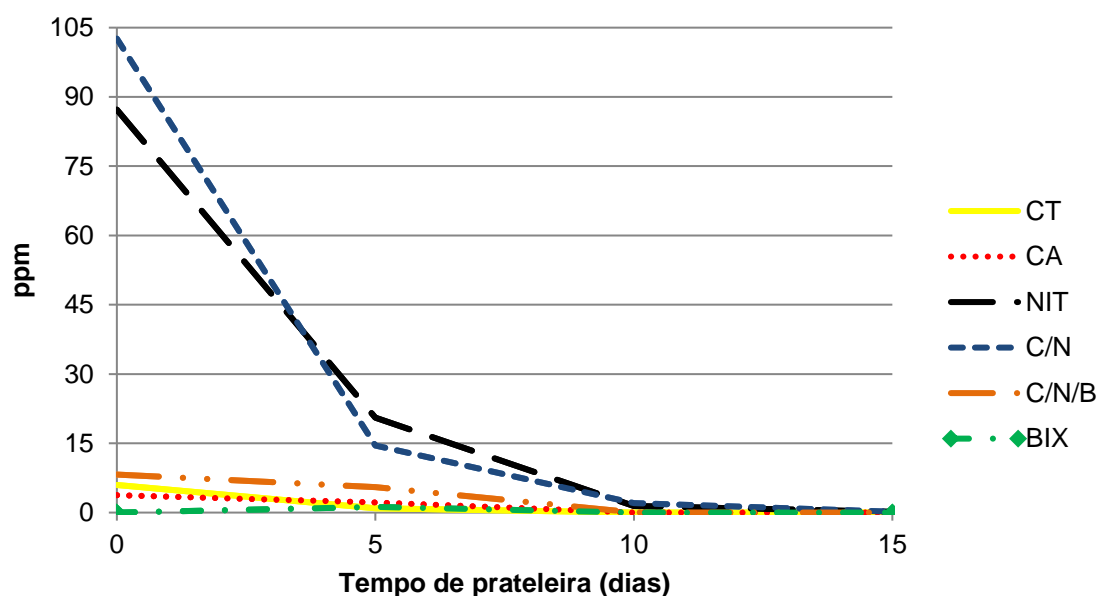


GRÁFICO 1 – NITRITO RESIDUAL (PPM) AO LONGO DO TEMPO DE PRATELEIRA DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA. CT=Controle, CA=Carmim (40 ppm), NIT=Nitrito de sódio (150 ppm), C/N= Carmim/nitrito, C/N/B=substituição parcial e BIX= substituição total. FONTE: O Autor (2016).

Embora os valores identificados sejam inferiores aos limites preconizados pela legislação (150 ppm), em outros estudos envolvendo linguiças, os níveis de nitrito foram superiores (BRASIL, 2006). Oliveira *et al.* (2005) encontrou quantidades acima do permitido pela legislação, ao analisar 56 amostras de linguiça frescal de frango e de pernil. Valores variando de 1,2 a 221 ppm, para linguiças de frango, e 0,6 a 162 ppm nas linguiças de pernil foram observados, porém apenas 7 % das amostras estavam em desacordo com a legislação. Em amostras comerciais, de linguiças frescas e cozidas, 21,7% demonstraram teor residual de nitrito acima do limite máximo permitido (150 ppm), apresentando

quantidades oscilando entre 170 e 466 ppm de nitrito (DUARTE, 2010). As quantidades encontradas, em alguns casos relatam a adição acima do permitido pela legislação.

5.4. Efeito do Bixinato de Potássio sobre a Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica é um dos parâmetros utilizados para verificar o efeito do tempo de prateleira sobre produtos alimentícios. Quanto maior a quantidade de gordura presente, maior é a deterioração e consequentemente produção do odor desagradável, conhecido como ranço (DUARTE, 2010). A refrigeração tende a diminuir a atividade molecular, reduzindo a interação entre espécies oxidativas e os ácidos graxos insaturados presentes no alimento (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2010). Segundo Limbo *et al.* (2010), o armazenamento de carne em temperaturas mais elevadas (15,5°C e 8,1°C), demonstra maiores valores de TBARS, quando comparadas à amostras refrigeradas a 4,3°C.

Os resultados da oxidação das amostras de linguiça toscana armazenadas sob refrigeração (4°C) encontram-se na TABELA 4. Os valores de TBARS, de forma geral, apresentaram oscilação dos níveis detectáveis, no entanto, pode ser observada a evolução nos valores de oxidação após 15 dias de armazenamento. O controle, ao longo do armazenamento, apresentou oscilação nos valores de TBARS (0,193 a 0,259 mg TBARS/Kg). O tratamento carmim apresentou resultados similares ao controle, apresentando a segunda maior média após 15 dias. Os demais tratamentos, quando comparados ao controle, apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) ao final do armazenamento. Kandem *et al.* (2007), ao desenvolver amostras de linguiças Toscana com adição de especiarias, observou evolução dos valores de TBARS na amostra controle ao longo do tempo de prateleira (14 dias).

A atividade antioxidante do nitrito pode ser observada quando adicionado em concentrações próximas a 40 ppm ao produto (Al-Shuibi e Al-Abdullah, 2002). As amostras contendo 150 ppm de nitrito de sódio (NIT e C/N) foram as

amostras com menores valores absolutos de oxidação lipídica durante o tempo de armazenamento.

O tratamento com substituição parcial de nitrito e carmim por bixinato apresentou valores similares aos tratamentos com uso nitrito, oscilando entre 0,169 e 0,194 mg TBARS/Kg, aproximadamente. Nas amostras com substituição total do carmim e nitrito pelo bixinato, a oxidação lipídica permaneceu constante ao longo dos 15 dias de armazenamento, porém, ainda que este tratamento tenha reduzido a oxidação quando comparado ao controle, mostrou-se menos efetivo que os tratamentos com nitrito.

TABELA 4 – OXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS) DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇAS TOSCANA.

Tratamentos	Oxidação Lipídica (mg TBARS/Kg)			
	Tempo de armazenamento (dias)			
	0	5	10	15
CT	0,193 ^{a, c} (±0,013) A	0,196 ^a (±0,014) A,B	0,195 ^{a, b} (±0,021) A	0,259 ^a (±0,030) B
CAR	0,170 ^{a, b} (±0,014) A	0,186 ^{a, c} (±0,009) A	0,161 ^a (±0,019) A	0,199 ^b (±0,033) A
NIT	0,115 ^b (±0,016) A	0,139 ^b (±0,009) A,B	0,268 ^b (±0,079) B	0,151 ^b (±0,014) A,B
C/N	0,152 ^{a, b} (±0,040) A	0,143 ^{b, c} (±0,014) A	0,204 ^{a, b} (±0,010) A	0,188 ^b (±0,010) A
C/N/B	0,181 ^{a, b} (±0,004) A	0,169 ^{a, b} (±0,014) A	0,172 ^{a, b} (±0,007) A	0,194 ^b (±0,010) A
BIX	0,250 ^c (±0,038) A	0,203 ^a (±0,005) A	0,201 ^{a, b} (±0,013) A	0,201 ^b (±0,013) A

^{a,b,c} Na mesma coluna sobrescritos diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). A,B: Na mesma linha, médias contendo diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Teste de Tukey.

Bolognesi (2014) avaliou diferentes concentrações de sal de bixina (250 e 500 ppm) como substituto do nitrito de sódio em amostras de jerked beef. A substituição parcial, contendo 250 ppm de bixinato de potássio e 75 ppm de nitrito, demonstrou os menores valores de TBARS quando comparado aos tratamentos com adição de 150 ppm de nitrito, substituição total do nitrito e ao grupo controle.

Em estudo avaliando pó de urucum (14mg bixina/g de sementes) e eritorbato de sódio quanto à oxidação lipídica em lombo de porco, o uso das substâncias isoladas ou combinadas apresentaram significativa capacidade de diminuir ou retardar o desenvolvimento de subprodutos decorrentes da oxidação lipídica, quando comparados ao tratamento controle (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). Castro, Mariutti e Bragagnolo (2010) avaliaram o uso de colorífico, mistura de sementes trituradas de urucum com farinha de milho, quanto ao seu efeito antioxidante em hambúrgueres crus e grelhados de frango. Durante 30 dias de armazenamento das amostras grelhadas, a oxidação lipídica foi reduzida pelo uso do colorífico, efeito não observado em amostras cruas.

Nas amostras congeladas, no período de 90 dias de armazenamento, as amostras controle e carmim novamente apresentaram valores de TBARs mais elevados. Os tratamentos nitrito e C/N, quando comparados ao controle, apresentaram reduzida oxidação lipídica até os 60 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Em relação às amostras com bixina, a substituição parcial demonstrou menor oxidação em relação ao controle, no período do décimo quinto dia ao dia 90 de armazenamento (GRÁFICO 1).

Quando comparado os tratamentos, as amostras nitrito e carmim/nitrito apresentaram maior estabilidade quanto à oxidação até os 60 dias de armazenamento. A amostra C/N/B apresentou resultados semelhantes aos tratamentos com adição de 150 ppm de nitrito. A substituição total por bixina apresentou inicialmente maior oxidação lipídica para o dia 0, demonstrando reduzida oscilação até o dia 30, e se comportando como a o tratamento mais oxidado aos três meses.

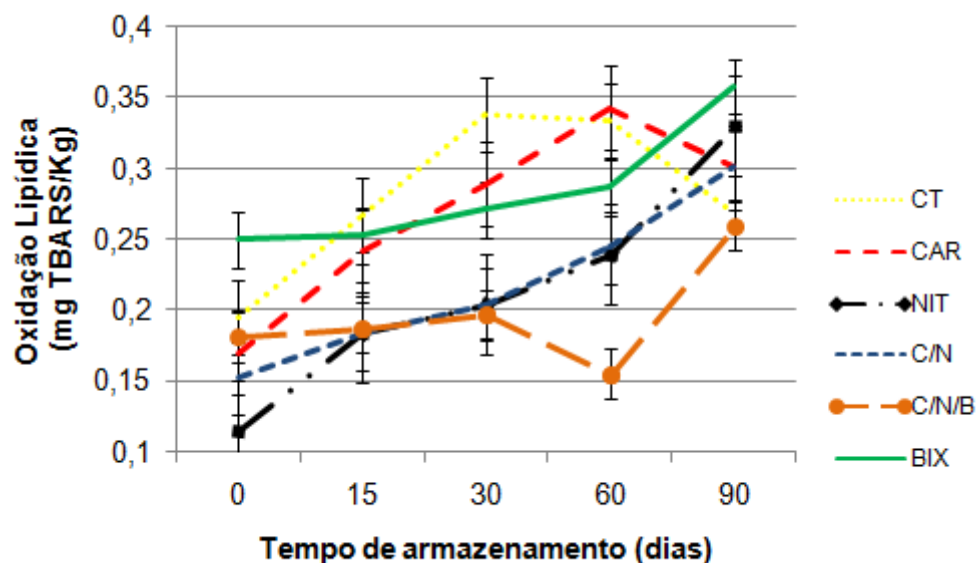


GRÁFICO 2 – OXIDAÇÃO LIPÍDICA DE AMOSTRAS CONGELADAS DE LINGUIÇAS TOSCANA APÓS 90 DIAS DE ARMAZENAMENTO. FONTE: O Autor (2016).

5.5. Análise Colorimétrica de Linguiças Toscana

5.5.1. Efeito da adição de diferentes concentrações de carmim sobre o parâmetro a^* das amostras experimentais e comerciais de linguiças toscana

A cor vermelha é característica de produtos cárneos em geral, constituindo um fator determinante para a aceitação junto aos consumidores. Como esperado, enquanto o tratamento formulado com 10 ppm de carmim, apresentou o menor valor de a^* (5,74), as amostras formuladas com 40 ppm alcançaram a média de 14,23. Houve um aumento do parâmetro a^* mensurado nas linguiças Toscanas, segundo a elevação da concentração de carmim, sendo os tratamentos diferentes significativamente ($p < 0,05$) (FIGURA 13).

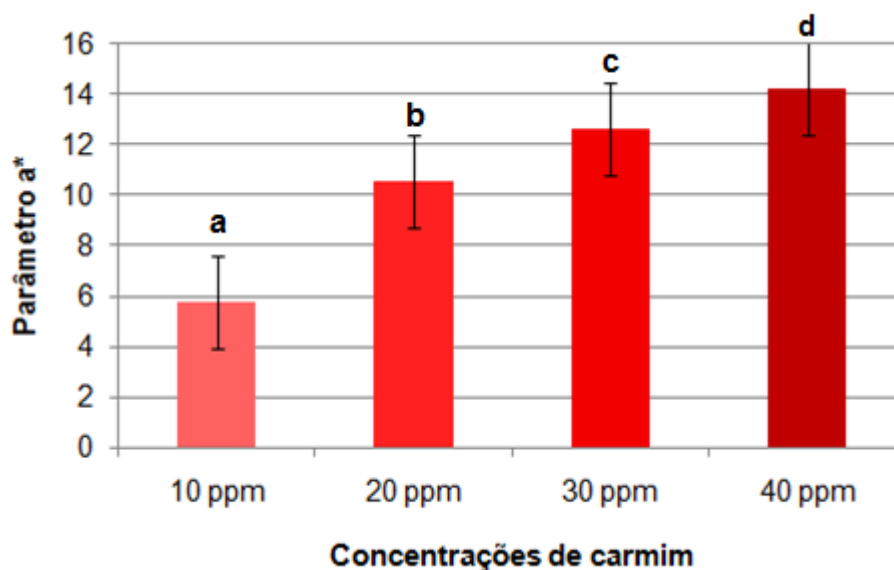


FIGURA 13 – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARMIM SOBRE A COORDENADA a^* DE LINGUIÇAS TOSCANA. FONTE: O Autor (2016).

Quando as amostras formuladas com 30 e 40 ppm de carmim (duas maiores médias de a^*) foram comparadas às amostras comerciais, o produto comercial 1 (C1) apresentou menor intensidade na cor vermelha (11,79), em relação as outras amostras C2 e C3 (14,28 e 14,61). Comparando os tratamentos com diferentes concentrações de carmim com as amostras comerciais, a quantidade de 40 ppm de carmim adicionada na linguiça, apresentou cor vermelha equivalente as amostras comerciais, C2 e C3 (FIGURA 14).

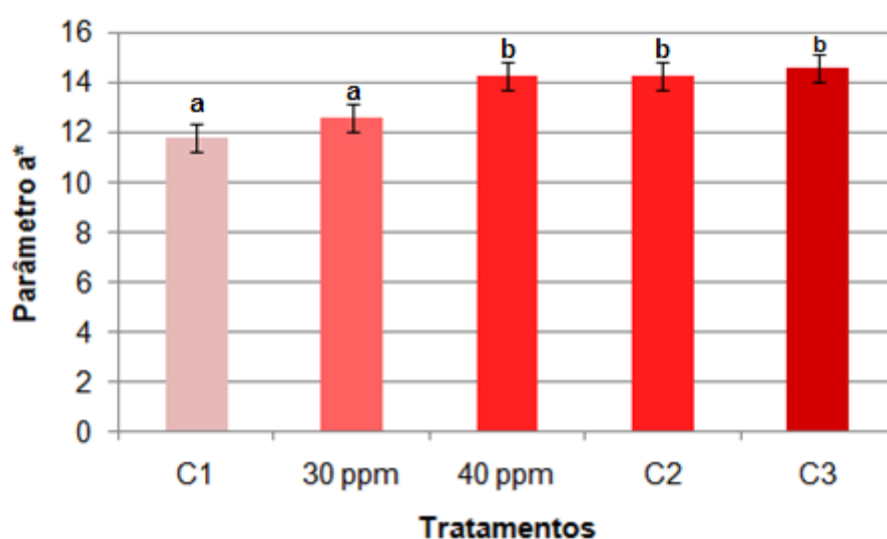


FIGURA 14 – INTENSIDADE DE COR VERMELHA DE AMOSTRAS COMERCIAIS E COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARMIM. FONTE: O Autor (2016).

A utilização do carmim nos derivados cárneos tem por objetivo conferir cor vermelha semelhante ao sangue ofertando, por consequência, aparência de frescor e melhor aceitação desses produtos junto ao consumidor (ROCHA GARCIA, CARVALHO e BOLOGNESI, 2015). Pesquisa avaliando corantes naturais em embutidos tipo salsicha alemã verificou que o uso do carmim proporcionou maior valor de a^* ao produto. A maior tonalidade vermelha resultou em uma melhor aceitação global quando comparado a outros corantes, como a curcumina, caramelo, extrato de páprica e β -caroteno, além do nitrito de sódio (BLOUKAS *et al.*, 1999).

5.5.2. Efeito do bixinato de potássio sobre a cor de linguças toscana em substituição ao nitrito de sódio e carmim

5.5.2.1. Desenvolvimento de cor vermelha (parâmetro a^*) das amostras refrigeradas de linguça toscana

Valores positivos do parâmetro a^* são representativos da coloração vermelha nos alimentos. Nas amostras refrigeradas, os tratamentos controle e nitrito apresentaram os menores valores de a^* , visto que o controle não apresenta adição de nenhum aditivo que promova a cor, enquanto o nitrito exige processos adicionais, como aquecimento, salga ou maturação para desenvolvimento da cor vermelha. O carmim, corante convencional das linguças proporcionou coloração vermelha intermediária e contornou a limitação de cor do nitrito nas amostras (C/N). As amostras contendo o sal de bixina apresentaram maior cor vermelha, ao longo do armazenamento ($p < 0,05$), segundo a elevação de concentração utilizada desse sal (FIGURA 15).

Os resultados se assemelham ao estudo realizado por Uyhara *et al.* (2008) que avaliou o efeito do uso de derivados do urucum e carmim de cochonilha em salsichas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A formulação contendo corante de urucum proporcionou maior valor de a^* quando comparado a adição do carmim de cochonilha.

Ao sofrer aquecimento, os tratamentos demonstraram comportamento semelhante, apresentando redução da cor vermelha durante o armazenamento com exceção do tratamento nitrito que se manteve constante durante o período. As amostras controle, C/N, C/N/B e BIX apresentaram elevação na cor vermelha quando expostas ao aquecimento no tempo inicial (dia 0). Após o quinto dia de armazenamento, os tratamentos apresentaram redução de a^* ($p < 0,05$), sendo o NIT o único a não apresentar redução de cor. Novamente, as amostras formuladas com bixinato apresentaram a cor vermelha mais intensa, segundo a maior concentração desse sal.

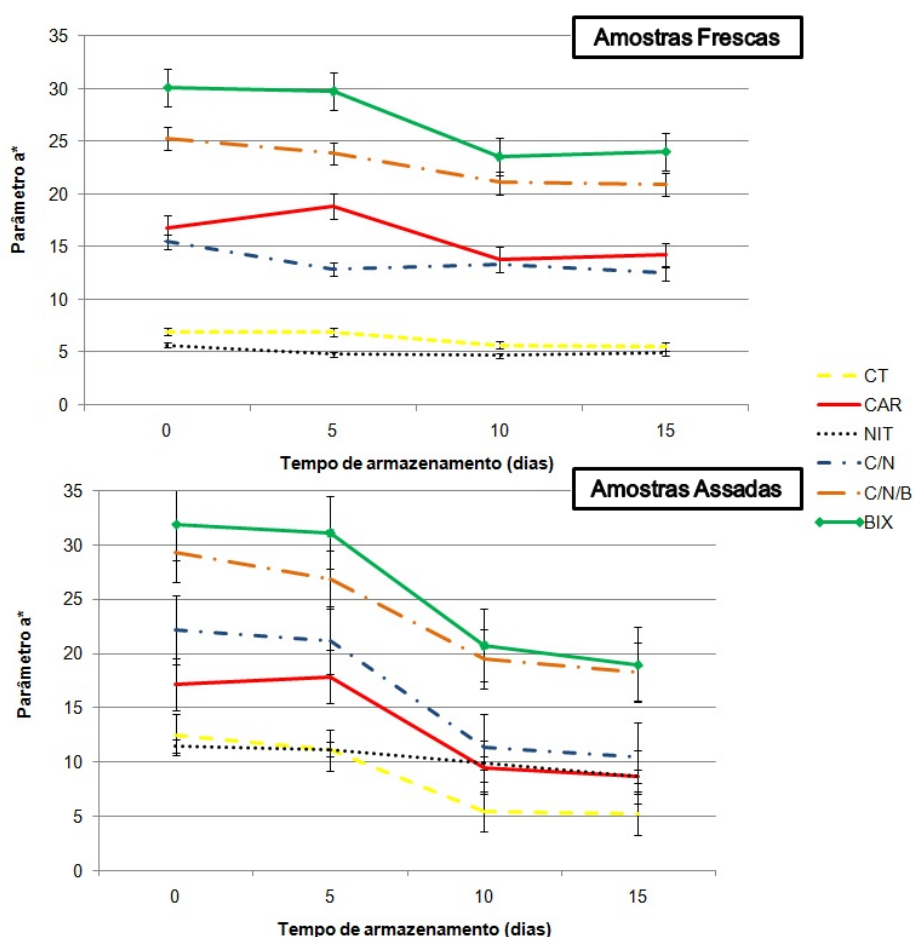


FIGURA 15 – PARÂMETRO a^* (COR VERMELHA) EM AMOSTRAS DE LINGUIÇAS TOSCANA ARMAZENADAS REFRIGERADAS. FONTE: O autor (2016).

5.5.2.2. Desenvolvimento de cor vermelha (parâmetro a^*) de linguiças toscana armazenadas congeladas

Nas amostras armazenadas sob congelamento, novamente as amostras controle e nitrito apresentaram valores reduzidos do parâmetro a^* , quando comparadas aos outros tratamentos sem processamento térmico ($p < 0,05$). Os tratamentos com adição de bixinato de potássio ofertaram maior cor vermelha ao produto, seguido dos tratamentos CAR e C/N. Após o trigésimo dia de armazenamento observou-se estabilidade de cor vermelha das amostras cruas e assadas (FIGURA 16).

Estudo avaliando a substituição parcial do nitrito por adição de diferentes concentrações de urucum observou que a elevação dos valores de a^* é proporcional a concentração de bixina utilizada (ZARRINGHALAMI, SAHARI e HAMIDI-ESFEHANI, 2009).

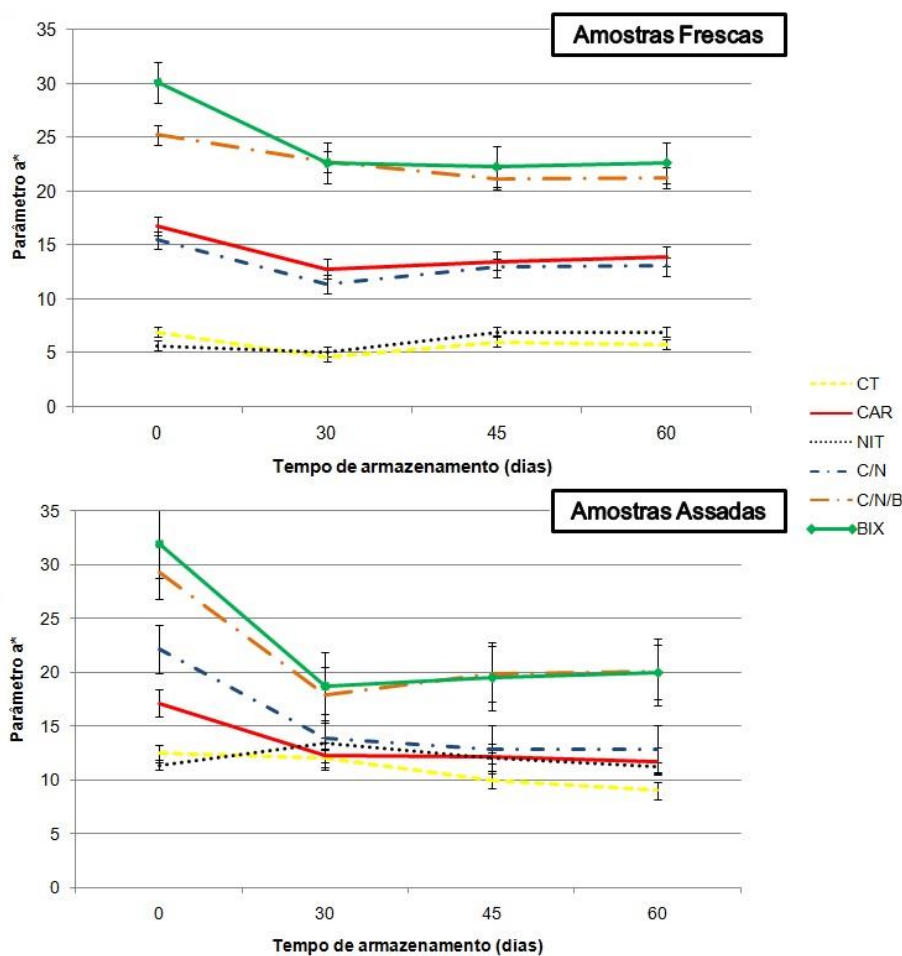


FIGURA 16 – PARÂMETRO a^* (COR VERMELHA) EM AMOSTRAS DE LINGUIÇAS TOSCANA ARMAZENADAS CONGELADAS. FONTE: O autor (2016).

5.5.2.3. Cor amarela (parâmetro b^*) de linguças toscana armazenadas refrigeradas

Os valores positivos do parâmetro b^* indicam a intensidade da cor amarela nas amostras de linguças Toscana. Verificou-se um aumento significativo desse parâmetro quando adicionado o bixinato de potássio aos tratamentos C/N/B e BIX. As amostras com 500 ppm de bixinato (BIX) apresentaram os maiores valores de b^* , seguida pelo tratamento com substituição parcial (C/N/B), ao longo do armazenamento. Zarringhalami, Sahari e Hamidi-Esfehani (2009) observaram que conforme a concentração de urucum se eleva, maior é o valor de b^* encontrado no produto cárneo. As amostras CT e NIT, apresentaram médias intermediárias, diferente do observado anteriormente para o parâmetro a^* . As amostras contendo carmim apresentaram comparativamente valores reduzidos do parâmetro b^* , em razão da intensa cor vermelha (FIGURA 17).

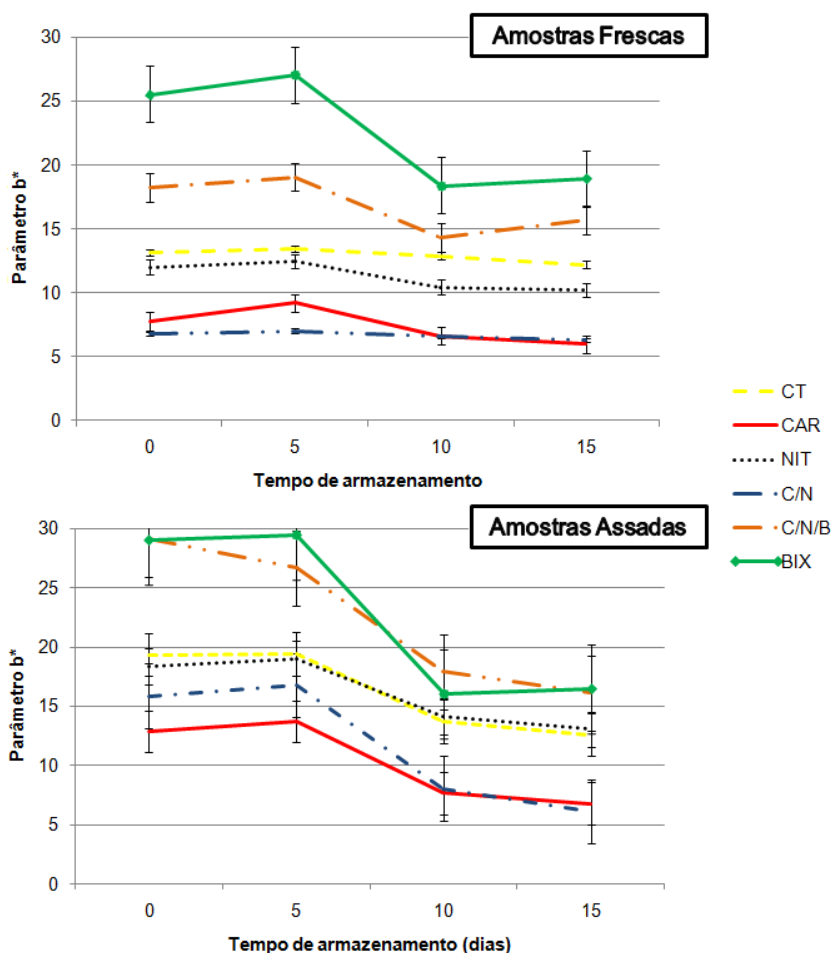


FIGURA 17 – PARÂMETRO b^* (COR AMARELA) DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇAS TOSCANA. FONTE: O autor (2016).

5.5.2.4. Cor amarela (parâmetro b^*) de linguiças toscana sob congelamento

Os tratamentos BIX e substituição parcial (C/N/B) apresentaram valores elevados de a^* , assim como do parâmetro b^* , demonstrando a capacidade da bixina ofertar as duas tonalidades, algo que pode ser indesejado dependendo da coloração característica do produto cárneo. Nesse contexto, sobretudo na coloração do produto fresco, a substituição parcial de nitrito e carmim por bixina pode ser uma alternativa que minimiza a tonalidade amarela no produto final (FIGURA 18).

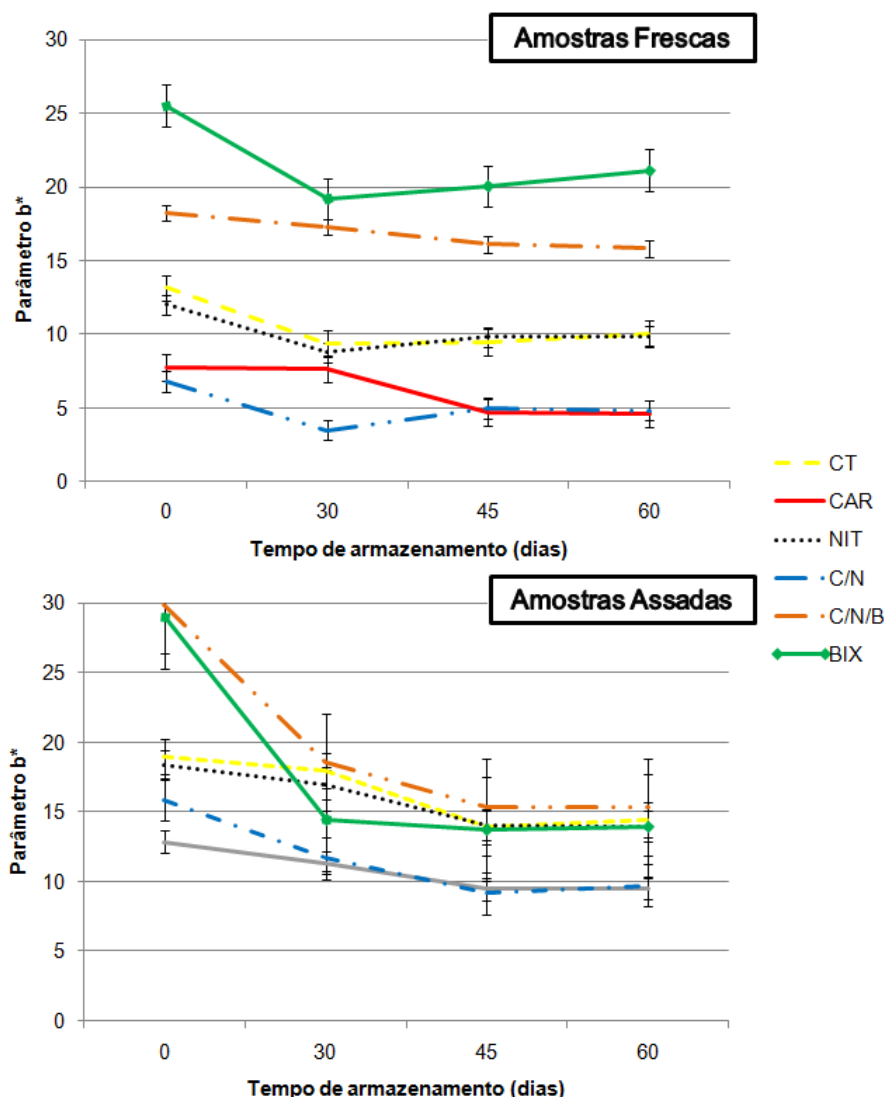


FIGURA 18 – PARÂMETRO b^* (COR AMARELA) DAS AMOSTRAS CONGELADAS DE LINGUIÇAS TOSCANA. FONTE: O autor (2016).

De forma geral, se verifica que nos primeiros 30 dias de armazenamento há uma redução nos valores de b^* , mantendo-se proporcionalmente estáveis os valores relativamente durante os próximos 30 dias. Os tratamentos com bixina se mostraram promotores da cor amarela nas amostras de linguiça Toscana, porém, apresentam as maiores reduções desse parâmetro, principalmente, nas amostras assadas.

5.5.2.5. Luminosidade (parâmetro L^*) em linguiças toscana armazenadas refrigeradas

A redução nos valores de L^* é indicativo do escurecimento do produto. Nas amostras armazenadas refrigeradas, o tratamento controle e nitrito apresentaram os maiores valores de L^* ($p < 0,05$) ao longo do tempo de prateleira. Por sua vez, as amostras formuladas com substituição total e parcial dos aditivos pelo sal de bixina (C/N/B e BIX), apresentam os menores valores de luminosidade durante os 15 dias de armazenamento (FIGURA 19).

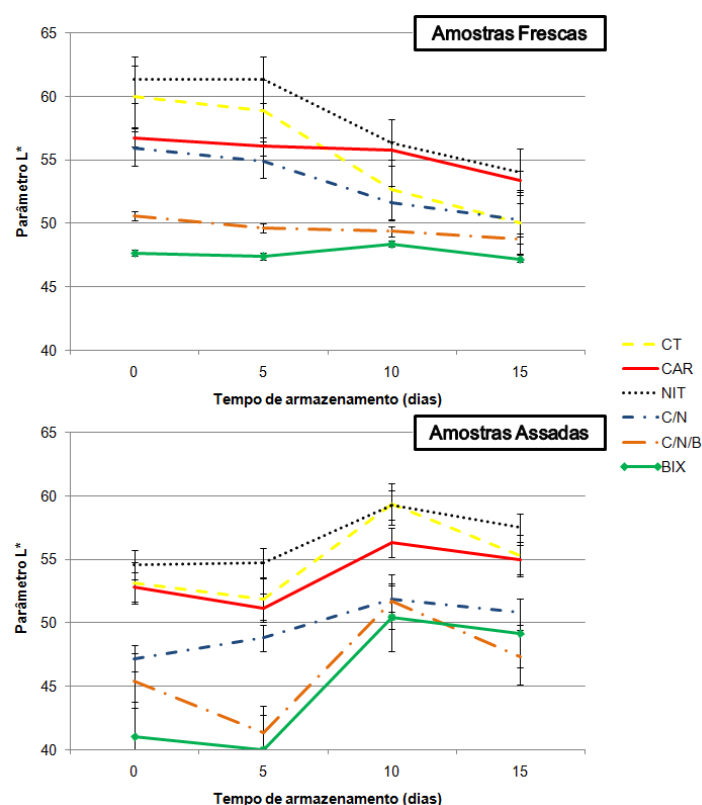


FIGURA 19 – PARÂMETRO L^* (LUMINOSIDADE) DE AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA. FONTE: O autor (2016).

Para as amostras assadas observa-se elevação dos valores médios de L^* após o dia 5 ($p < 0,05$). Este comportamento corrobora com o descrito por Castro, Mariutti e Bragagnolo (2010), que observaram em hambúrgueres formulados com colorífico de urucum a redução nos valores de L^* , sendo maior a luminosidade ao sofrer tratamento térmico, do que na forma frescal.

5.5.2.6. Luminosidade (parâmetro L^*) em linguças toscana armazenadas congeladas

Nas amostras armazenadas sob congelamento, na forma frescal, os tratamentos controle (CT) e nitrito de sódio (NIT) apresentaram maiores valores de luminosidade. Os tratamentos com substituição parcial (C/N/B) e total (BIX) dos aditivos carmim e nitrito novamente apresentaram os menores valores de L^* . As amostras com carmim apresentaram médias intermediárias, quando comparados aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Ao longo do armazenamento, os tratamentos CAR e C/N/B apresentaram estabilidade da luminosidade, ao contrário dos demais que apresentaram oscilação nos valores de L^* ao longo dos dois meses de armazenamento (FIGURA 20).

Nas amostras assadas, os valores médios de luminosidade decaíram quando comparado às amostras frescas ao longo do armazenamento. No tratamento C/N, nos dias analisados, a luminosidade foi significativamente reduzida após o tratamento térmico ($p < 0,05$).

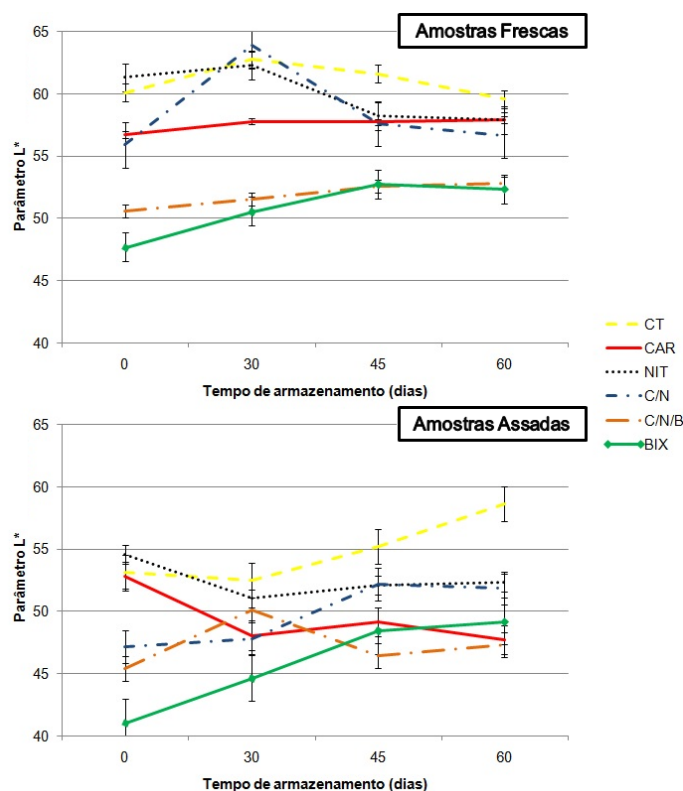


FIGURA 20 – PARÂMETRO L* (LUMINOSIDADE) EM LINGUIÇAS TOSCANA ARMAZENADAS CONGELADAS. FONTE: O autor (2016).

5.6. Análise Microbiológica das formulações de linguiça toscana

Os parâmetros microbiológicos são fundamentais para inocuidade de qualquer produto e as linguiças frescas têm elevada probabilidade de contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes, devido à alta atividade de água, manipulação da matéria prima, ausência de tratamento térmico e condições de armazenamento (TERRA, 2003).

A contagem total de aeróbios mesófilos é um método utilizado como indicador geral da população bacteriana no alimento, não diferenciando os tipos de bactérias. O seu uso fornece informações gerais sobre a qualidade do produto, matérias primas utilizadas, manipulação, vida de prateleira e entre outros fatores (SILVA *et al.*, 2007).

De forma geral, os tratamentos apresentaram contagem total de aeróbios mesófilos na faixa de 5,08 a 6,88 log UFC/g de produto. Observa-se que ao decorrer do tempo de armazenamento, todos os tratamentos apresentaram elevação da população de bactérias mesófilas (TABELA 5).

TABELA 5 – CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS MESÓFILOS (log UFC/g) DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA

Microrganismo	Tempo de prateleira (dias)			
	Tratamentos	0	7	14
Mesófilos	CT	*6,11	6,66	6,32
	CAR	6,08	6,62	6,88
	NIT	6,28	5,08	6,88
	C/N	6,23	5,08	6,57
	C/N/B	6,26	5,28	6,80
	BIX	6,26	6,08	6,79

*Contagem em log UFC/g.

As amostras também foram avaliadas quanto à contagem de bolores e leveduras, sendo esses microrganismos em sua maioria originada do solo ou do ar (SILVA *et al.*, 2007). Os tratamentos apresentaram contagens de 3,88 a 6,88 log UFC/g, observando elevação na contagem de ao longo do armazenamento (TABELA 6). Situação semelhante foi encontrada por Correia (2008), a qual observou multiplicação no número de mesófilos, ao longo do armazenamento, em linguiças frescas formuladas com diferentes concentrações de sais de cura (50, 150 e 200 ppm) e temperaturas de estocagem (7 °C e 12°C).

A presença de bolores e leveduras em índices elevados nos alimentos fornece informações sobre as condições higiênico-sanitárias deficientes nos equipamentos, processamento e matéria prima contaminada. Os resultados obtidos estão dentro dos limites comumente encontrados em amostras analisadas pelo Serviço de Inspeção Estadual e Federal do Paraná. A contagem de bolores e leveduras no estudo variou de 2,69 a 8.70 log UFC/g (SOUZA *et al.*, 2014).

TABELA 6 – CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA

Microrganismo	Tempo de prateleira (dias)			
	Tratamentos	0	7	14
Bolores e leveduras	CT	*4,18	6,88	6,87
	CAR	4,04	6,65	6,85
	NIT	4,04	5,45	6,11
	C/N	3,88	4,08	6,08
	C/N/B	4,30	6,82	6,23
	BIX	4,41	6,58	6,38

*Contagem em log UFC/g.

A contaminação por *Staphylococcus sp.* sugere manipulação inadequada dos cortes de carne durante a elaboração dos produtos cárneos. No tempo zero todas as amostras se encontram dentro do limite permitido pela legislação, variando as contagens 2,95 a 3,48 log UFC/g ou 9×10^2 a $3,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001). No decorrer do tempo de prateleira, as amostras apresentaram variação da contagem, como na amostra controle (CT), estando acima do limite permitido no dia 14 (4,00 log UFC/g). O tratamento BIX apresentou após 7 dias de armazenamento contaminação por *Staphylococcus sp.* inferior ao controle, porém, superior ao nitrito (TABELA 7).

TABELA 7 – CONTAGEM DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA DAS AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA

Microrganismo	Tempo de prateleira (dias)			
	Tratamentos	0	7	14
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	CT	*3,15	3,65	4,00
	CAR	3,40	3,54	3,48
	NIT	3,28	3,30	3,00
	C/N	3,08	3,40	3,00
	C/N/B	3,48	3,30	3,30
	BIX	2,95	3,70	3,48

*Contagem em log UFC/g.

Marques *et al.* (2006) observaram em amostras comerciais de linguiça 35% se apresentavam impróprias para consumo, em relação a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva ($> 4,00$ log UFC/g) acima do limite preconizado. As contagens em nosso trabalho, corroboram com resultados obtidos por Tessmann *et al.* (2001), o qual analisou 25 amostras de linguiça

frescal de carne suína, não observando contagem acima do permitido pela legislação.

A contagem de coliformes termotolerantes reflete a condição higiênico-sanitária do processamento de alimentos, sendo a presença indicativo de contaminação fecal no alimento “*in natura*”, principalmente por *E.coli* (SILVA *et al.*, 2007). A análise de coliformes termotolerantes demonstrou uma redução de contagem durante o tempo de prateleira (dia 0 ao dia 14). Os tratamentos CT, CAR e C/N/B apresentaram contagem maior que 3,04 log NMP/g no tempo 0, ocorrendo decréscimo da contagem nas análises posteriores. Ao final do tempo de prateleira, os tratamentos demonstraram contagem dentro do estabelecido em legislação, e as amostras contendo sal de bixina (BIX e C/N/B) apresentaram contagem inferiores ao tratamento controle e nitrito, no entanto, deve ser considerada a ampla variação entre os tratamentos e o período de armazenamento (TABELA 8).

TABELA 8 – CONTAGEM DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM AMOSTRAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA

Microrganismo	Tempo de prateleira (dias)			
	Tratamentos	0	7	14
Coliformes termotolerantes	CT	*>3,04	2,38	1,97
	CAR	>3,04	2,38	1,36
	NIT	3,04	1,97	1,97
	C/N	3,04	2,38	1,36
	C/N/B	>3,04	2,18	1,36
	BIX	3,04	1,88	1,36

*Contagem em log NMP/g.

A presença de *Salmonella sp.* e *Clostridium* sulfito redutores foram avaliadas nos dias 0, 7 e 14, entretanto em todas as análises os microrganismos se encontraram ausentes.

5.7. Efeito da substituição de carmim e nitrito de sódio por sal de bixina na análise sensorial de linguiças toscana

5.7.1. Efeito das diferentes concentrações de carmim sobre a aceitação sensorial de linguças toscana

Os provadores demonstraram em teste de ordenação de preferência que as amostras formuladas com 30 e 40 ppm de carmim foram as preferidas, resultando em uma significância de 5%. Essa escolha demonstra que a elevação das concentrações de carmim e por consequente, da cor vermelha, como verificado no ITEM 5.5.1., é um fator promotor da aceitação pelos provadores (FIGURA 21).

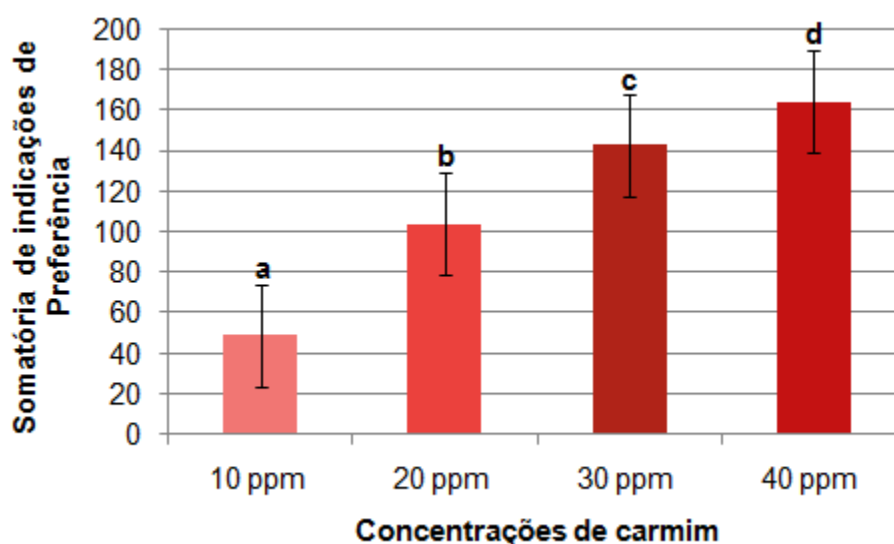


FIGURA 21 – PREFERÊNCIA DOS PROVADORES POR AMOSTRAS DE LINGUIÇAS TOSCANA FORMULADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CARMIM (10, 20, 30 E 40 PPM).

Posteriormente, quando comparada às amostras comerciais, a linguça com maior concentração de carmim (40 ppm) apresentou indicação de preferência intermediária às amostras comerciais (C2 e C3), preferidas pelos consumidores, permitindo padronizar uma concentração de carmim a ser utilizada nos testes de substituição por sal de bixina. A preferência visual dos consumidores coincide novamente com as amostras que apresentaram maiores valores de a^* (FIGURA 22).

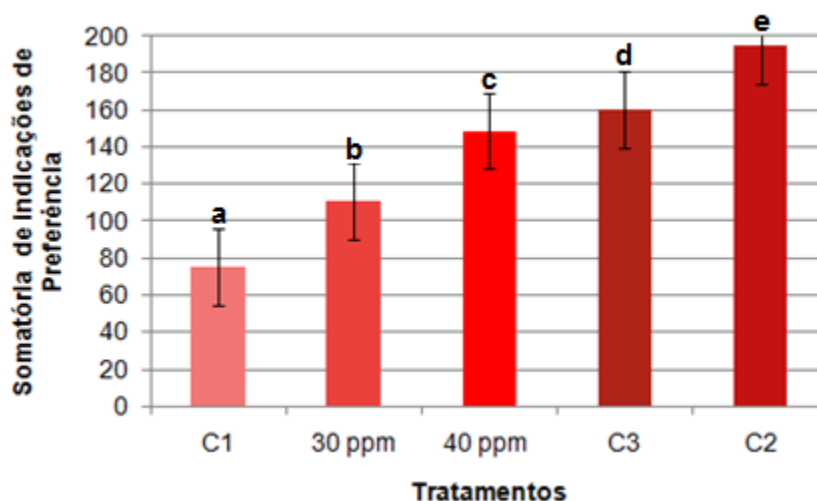


FIGURA 22 – COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS 30 E 40 PPM DE CARMIM COM AMOSTRAS COMERCIAIS DE LINGUIÇAS TOSCANA. FONTE: O Autor (2015).

5.7.2. Efeito da substituição do carmim e nitrito pelo bixinato de potássio sobre a aparência visual das linguiças toscana

Na análise sensorial visual das linguiças refrigeradas e avaliadas na forma frescal, os tratamentos contendo carmim ou mesmo este combinado ao nitrito foram preferidos pelos consumidores, enquanto amostras contendo apenas nitrito obtiveram a pior aceitação (FIGURA 23). Esse comportamento deve-se a coloração vermelha emprestada pelo carmim ao produto frescal e à iluminação desse atributo no tratamento frescal com nitrito.

As linguiças frescas formuladas com uso de bixina apresentaram aceitação superior ao controle e ao produto contendo somente nitrito, nesse contexto, as amostras formuladas com substituição parcial dos aditivos por bixina apresentou melhores médias.

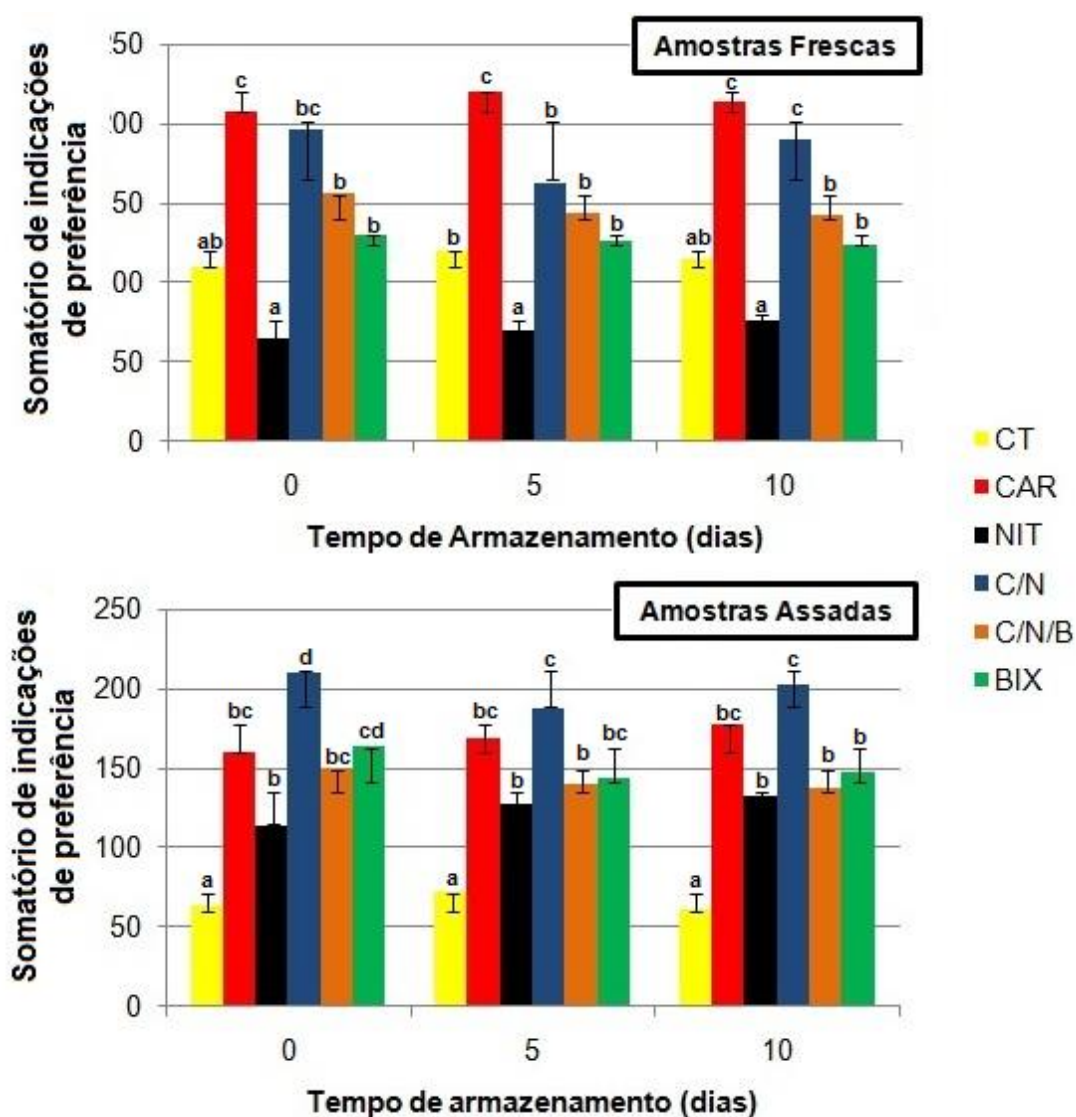


FIGURA 23 – ANÁLISE SENSORIAL VISUAL POR ORDENAÇÃO DAS AMOSTRAS ARMAZENADAS REFRIGERADAS DE LINGUIÇA TOSCANA. FONTE: O Autor (2016).

Após o aquecimento, as amostras contendo nitrito apresentam melhora de aceitação e o produto formulado com sal de cura e carmim apresenta melhor preferência visual durante os 10 dias de armazenamento refrigerado. As linguiças formuladas somente com bixina também apresentaram melhora de aceitação. De forma geral, não foram observadas alterações significativas no comportamento dos tratamentos durante os 10 dias de armazenamento refrigerado.

Nas amostras armazenadas congeladas, se verifica comportamento semelhante ao armazenamento refrigerado. As amostras frescas preferidas são formuladas com carmim, ratificando a importância desse corante e da cor vermelha para aceitação do produto. De forma oposta, se verifica no controle e formulações contendo nitrito exclusivamente, limitada aceitação (FIGURA 24).

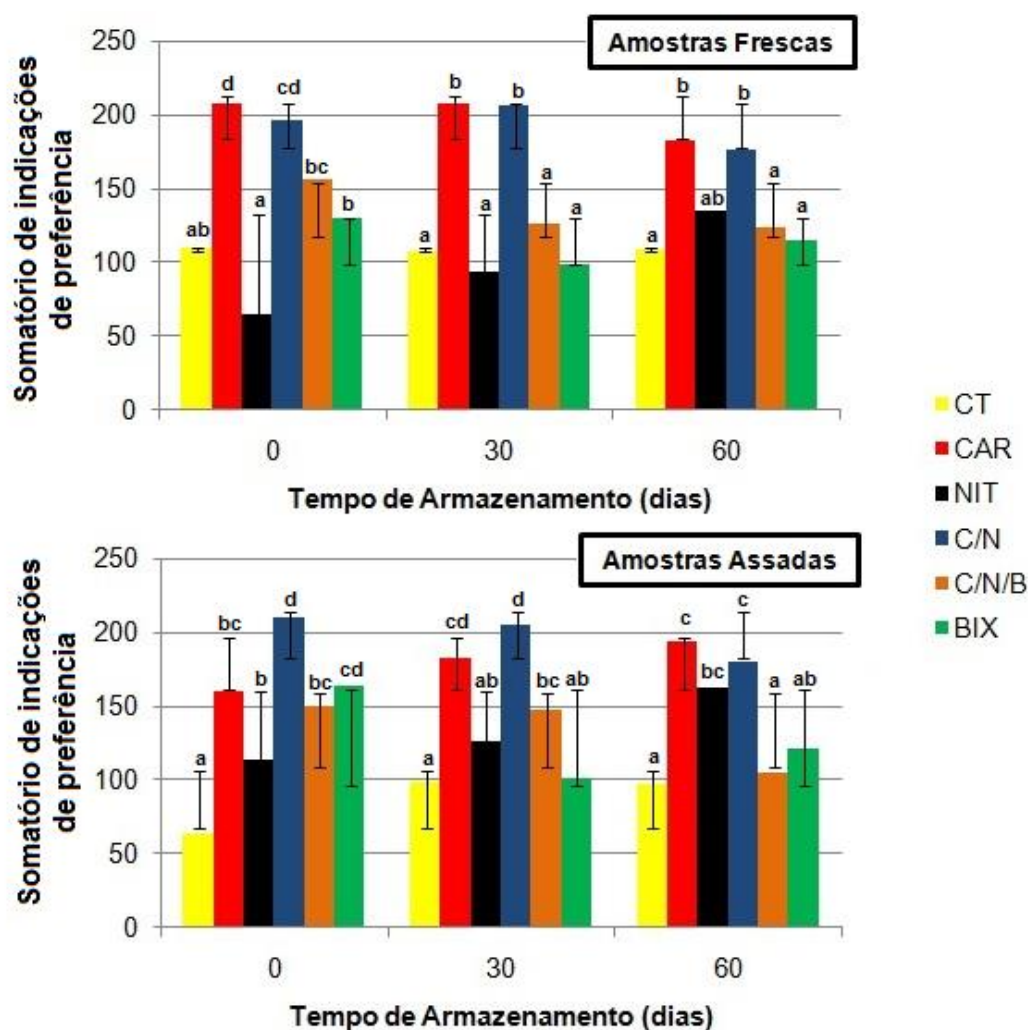


FIGURA 24 – ANÁLISE SENSORIAL VISUAL POR ORDENAÇÃO DE PREFERÊNCIA DAS AMOSTRAS ARMazenADAS CONGELADAS DE LINGUIÇA TOSCANA. FONTE: O Autor (2016).

Após o aquecimento, o vermelho emprestado pelo nitrito potencializa a aceitação dos produtos, em razão da formação de nitroso-hemocromo (FARIA *et al.*, 2001). Durante todo o período avaliado, amostras contendo bixina

apresentaram aceitação maior que o controle, porém, inferiores aos tratamentos com carmim.

5.7.3. Efeito da substituição do carmim e nitrito pelo bixinato de potássio sobre a percepção de gosto das linguças toscana

Na análise sensorial de degustação em teste triangular, procurou-se verificar se o provador conseguiria identificar a presença do sal de bixina. No teste, 31 provadores ($n=50$) conseguiram identificar a amostra diferente, apresentando 0,1% de significância (FIGURA 25).

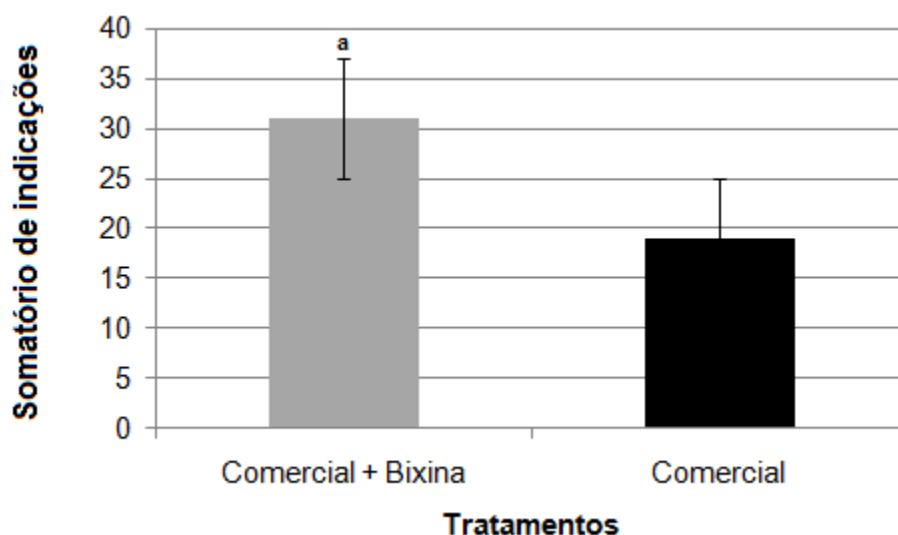


FIGURA 25 – ANÁLISE SENSORIAL DE GOSTO POR TESTE TRIANGULAR DE LINGUIÇAS TOSCANA ASSADAS. FONTE: O Autor (2016).

Com o objetivo de verificar se a diferença encontrada pelos provadores no teste anterior apresentaria efeito positivo ou não sobre os provadores, realizou-se também o teste de ordenação de preferência. O tratamento comercial, formulado com carmim, nitrito e bixina foi o preferido pelos provadores, alcançando 41 indicações ($p<0,01$). Portanto, ainda que detectável, a presença do sal de bixina favoreceu a aceitação dos provadores (FIGURA 26).

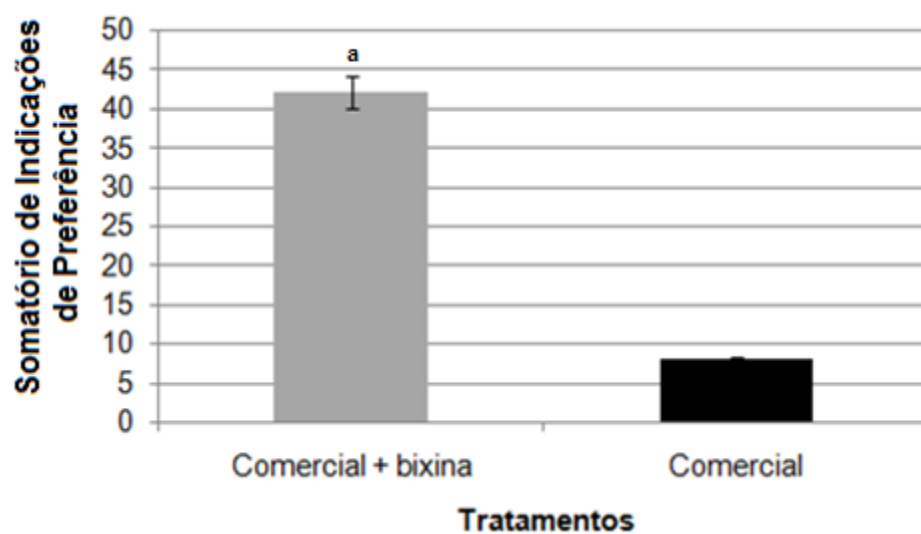


FIGURA 26 – ANÁLISE SENSORIAL DE GOSTO POR TESTE DE ORDENAÇÃO DE PREFERÊNCIA DE LINGUIÇAS TOSCANA ASSADAS. FONTE: O Autor (2016).

6. CONCLUSÃO

O sal de bixina mostrou ser uma alternativa ao uso do carmim e nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos. Ainda que não tenha influenciado a contagem microbiana, apresentou ação antioxidante e capacidade de ofertar cor vermelha ao produto promovendo melhoria de aceitação junto aos provadores. Embora o sal de bixina empreste também uma coloração amarela que limita sua aceitação quando comparada a outros aditivos, o uso combinado à substituição parcial de nitrito e carmim pode oportunizar embutidos de qualidade com redução dos níveis desses aditivos. Maiores estudos são necessários para adequar as concentrações utilizadas às particularidades dos processos e características desejáveis pelos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Estatísticas 2014**. Disponível em <<http://www.abipecs.com.br>>. Acessado em 25 de Janeiro de 2015.
- ABREU, R. C.; KIEFER, C.; ALVES, F. V.; COELHO, R. G.; MARÇAL, D. A.; RODRIGUES, G. P. Perfil lipídico da carne e gordura de suínos alimentados com milho. **Ciência Rural**, v.44, n.1, p.135-140, 2014.
- ACERO, S.; TABAR, A. I.; ALVAREZ, M. J.; GARCIA, B. E.; OLAGUIBEL, J. M.; MONEO, I. Occupational asthma and Food allergy due to carmine: Case report. **Allergy**, v. 53, p. 897-901, 1998. AL-SHUIBI, A. M.; AL-ABDULLAH, B. M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. **Meat Science**, v.62, p.473-478, 2002
- ALVES, R. W. **Extração de corantes de urucum por processos adsorptivos utilizando argilas comerciais e coloidal gás aprotos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- ALVES, R.W.; SOUZA, A.A.U.; SOUZA, S.M.A.G.U. Extração por agitação mecânica de sementes de urucum (*Bixa orellana*), purificação e análise dos extratos por espectrofotometria e HPLC. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p.23-34, 2008).
- AL-SHUIBI, A. M.; AL-ABDULLAH, B. M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. **Meat Science**, v.62, p.473-478, 2002.
- ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos**. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 201f, Campinas, 2004.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: Teoria e Prática**. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2001.
- ARSLAN, Z. K.; AYCAN, S. An example of the use of spectrophotometric method: determining the carmine in various food products. **Procedia – Social and Behavioral Sciences**, v. 116, p. 4622-4625, 2014.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIALANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17ed.,v.I e II, Gaithersburg, 2000.
- BAER, A. A.; DILGER, A. C. Effect of fat quality on sausage processing, texture, and sensory characteristics. **Meat Science**, v. 92, p. 1242-1249, 2014.
- BARANYOVITS, F. L. C. Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role. **Endeavour**, v. 2, n. 2, p. 85-92, 1978.
- BARBUT, S. Review: Automation and meat quality-global challenges. **Meat Science**, v. 96, p. 335-345, 2014.

BARROS, V. R. M.; PAVIA, P. C.; PANETTA, J. C. Salmonella spp: sua transmissão através dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 94, p. 15-19, 2002.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4th revised and extended ed. Springer, Heidelberg. 2009.

BENDALL, J. The swelling effect of polyphosphates on lean meat. **Journal Science Food Agriculture**, v. 5, p. 468, 1972.

BENEDETTI, S.; BRUNGERA, A.; RIZZATTI, R.; DICKEL, E. L.; BERTOLIN, T. E. Substituição parcial de nitrito por antioxidantes e seu efeito sobre a cor de linguiça defumada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.3, p.206-301, 2011.

BERDANIER, C. D. Food Constituents. In: BERDANIER, C. D.; DWYER, J.; FELDMAN, E. B. **Handbook of Nutrition and Food**. Boca Raton, Florida: CRC press, 2008. Cap. 1, p. 12.

BERNARDI, D. M.; ROMAN, J. A. Caracterização sensorial de linguiça Toscana com baixo teor de sódio e análise do consumo de carne suína e derivados na região oeste do Paraná. **Boletim do CEPPA**, v.29, n.1, p.33-42, 2011.

BITTENCOURT, C.; FELICISSIMO, M. P.; PIREAUX, J. J.; HOUSSIAU, L. ToF-SIMS characterization of thermal modifications of bixin from *Bixa orellana* fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.6195-6200, 2005.

BLOUKAS, J. G.; ARVANITOYANNIS, I. S.; SIOPI, A. A. Effect of natural colourants and nitrites on colour attributes of frankfurters. **Meat Science**, v. 52, p. 257-265, 1999.

BOLOGNESI, V. J. **Desenvolvimento de jerked beef utilizando sal de bixina como substituinte do nitrito de sódio**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BONAN, S.; FEDRIZZI, G.; MENOTTA, S.; ELISABETTA, C. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. **Dyes and Pigments**, v. 99, p. 36-40, 2013.

BORGES, M. E.; TEJERA, R. L.; DÍAZ, L.; ESPARZA, P.; IBÁÑEZ, E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1855-1860, 2012.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 98-104, 2002.

BRASIL. RIISPOA. Decreto n. 30.691, 29 de Março de 1952. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, **Diário Oficial da União**, de 7 de Julho de 1952.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa n.4. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de lingüiça e de salsicha. **Diário Oficial da União**, Brasília. 31 de março de 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.7, 10 de Janeiro de 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa n.62. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília. 18 de Setembro de 2003.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa n.51, de 29 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus limites em Alimentos 8: Carnes e Produtos Cárneos. Brasília, **Diário Oficial da União**, Seção 1, de 04 de Janeiro de 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Cochonilha do carmim na palma forrageira. Formulário de espécies incluídas no regime de proteção**, 2010. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Importacao/Requisitos%20Sanit%C3%A1rios/Rela%C3%A7%C3%A3o%20de%20Pragas/Cochonilha%20do%20Carmim%20na%20Palma%20Forrageira.pdf>. Acesso em: 25 de Maio de 2015.

CANTO, W. L.; OLIVEIRA, V. P.; CARVALHO, P. R. N.; GERMER, S. P. M. **Produção e mercado de urucum no Brasil**. Campinas, São Paulo. ITAL, 1991.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella spp.* **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n.2, p.95-101, 2006.

CASSENS, R. G (1990). Nitrite-cured meat. Trumbull: Food and Nutrition Press Inc.

CASTRO, W. F.; MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 124, p.126-131, 2011.

CHISTÉ, R. C.; YAMASHITA, F.; GOZZO, F. C.; MERCADANTE, A. Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.57-63, 2011.

CHUNG, K.; BAKER JR, J. R.; BALDWIN, J. L.; CHOU, A. Identification of carmine allergens among three carmine allergy patients: Case report. **Allergy**, v. 56, p. 73-77, 2001.

CONCEIÇÃO, F. V. E.; GONÇALVES, E. C. B. A. Qualidade físico-química de mortadelas e carnes moídas e conhecimento dos consumidores na conservação destes produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 283-290, 2009.

CORREIA, L. M. M. **Multiplicação de microbiota autóctone e de *Staphylococcus aureus* inoculado em linguças frescas produzidas com diferentes concentrações de sais de cura**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COSTA, C. L. S. C.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: Uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

COSTA, C. K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

CUI, H.; GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. **Food Control**, v. 21, p. 1030-1036, 2010.

DAPSON, R. W. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 82, n. 4-5, p. 173-187, 2007.

DUARTE, M.T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguças do topo fresco e cozida comercializadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2010.

EFSA. European Food Safety Authority. The Effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal, v.14, p.1-31, 2003.

EKICI, L.; OZTURK, I.; KARAMAN, S.; CALISKAN, O.; TORNÜK, F.; SAGDIC, O.; YETIM, H. Effects of black carrot concentrate on some physicochemical, textural, bioactive, aroma and sensory properties of sucuk, a traditional Turkish dry-fermented sausage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, p. 718-726, 2015.

FAO. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVE (JECFA). **Evaluation of Certain Food Additive and Contaminants: Carmines**. 55th Meeting, Geneva, 2001.

FARIA, J. A. F.; FELÍCIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e estabilidade da cor de produtos cárneos curados: Revisão. **Revista TEC Carnes**, v.3, n.2, p.16-22, 2001.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: Sodium Nitrite. **Code of Federal Regulations**, v.23, title.21, 2015.

FIGUEIREDO, B. C.; TRAD, I. J.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Effect of annatto powder and sodium erythorbate on lipid oxidation in pork loin during frozen storage. **Food Research International**, v.65, p.137-143, 2014.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996.

FERREIRA, A. C. B.; FONSECA, L. M.; SANTOS, W. L. M. Composição centesimal e aceitação de linguiça elaborada com reduzido teor de gordura e adicionada de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.209-214, 2009.

FORD, G. P.; GOPAL, T.; GRANT, D.; GAUNT, I. F.; EVANS, J. G.; BUTLER, W. H. Chronic toxicity\carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 12, p. 897-902, 1987.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança Alimentar. São Paulo: Artmed, 2000.

GALVAN, A. P.; ROSA, G.; BACK, J.; LIMA, D. P.; CORSO, M. P. Aceitação sensorial de linguiça tipo Toscana com teor reduzido de gordura e adição de pectina e inulina. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.13, n.3, p.383-398, 2011.

GLITSCH, K. Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. **British Food Journal**, v.102, n.3, p.177-194, 2000.

GONZÁLEZ, M.; MÉNDEZ, J.; CARNERO, A.; LOBO, M. G.; AFONSO, A. Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6968-6974, 2002.

GONZÁLEZ, E. A.; GARCÍA, E. M.; NAZARENO, M. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. **Food Chemistry**, v. 119, p. 358-362, 2010.

GOSETTI, F.; CHIUMINATTO, U.; MAZZUCO, E.; MASTROIANNI, R.; MARENGO, E. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 454-462, 2015.

GRANT, D.; GAUNT, I. F.; CARPANINI, F. M. B. Teratogenicity and embryotoxicity study of carmine of cochineal in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 12, p. 913-917, 1987.

HAGIWARA, A.; IMAI, N.; DOI, Y.; NABAE, K.; HIROTA, T.; YOSHINO, H.; KAWABE, M.; TSUSHIMA, Y.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. Absence of Liver Tumor Promoting Effects of Annatto Extract (Norbixin), a Natural Carotenoid Food Color, in a Medium-term Liver Carcinogenesis Bioassay using Male F344 Rats. **Cancer Letters**, 2003.

HAILA, M. K.; LIEVONEN, M.; HEINONEN, M. Effects of lutein, lycopene, annatto, and α -tocopherol on autoxidation of triglycerides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2096-2100, 1996.

HAUTRIVE, T. P.; MARQUES, A. C.; KUBOTA, E. H. Avaliação da composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos de cortes cárneos comerciais de avestruz, suíno, bovino e frango. **Alimentos e Nutrição**, v.23, n.2, p.327-334, 2012.

HAYES, J. E.; STEPANYAN, V.; O'GRADY, M. N.; ALLEN, P.; KERRY, J. P. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quality indices and sensorial properties of raw and cooked pork stored in different packaging systems. **Meat Science**, v. 85, p. 289-296, 2010.

HEYDARI, R.; HOSSEINI, M.; ZARABI, S. A simple method for determination of carmine in food samples based on cloud point extraction and spectrophotometric detection. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 786-791, 2015.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v.78, p.68-75, 2008.

HOSPITAL, X. F.; CARBALLO, J.; FERNÁNDEZ, M.; ARNAU, J.; GRATACÓS, M.; HIERRO, E. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. **Food Control**, v.57, p.275-281, 2015.

HUGO, C. J.; HUGO, A. Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. **Trends in Food Science & Technology**, v.45, p.12-23, 2015.

HUI, Y. H. **Handbook of Food Science, Technology, and Engineering**. Boca Raton, Flórida. CRC press: Taylor & Francis Group, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 5 ed. São Paulo: IAL, 2008.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.1, p. 40-47, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara. 2004.

KANDEM, S.; PATRIGNANI, F.; GUERZONI, E. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage (Salsiccia) combining two commercial ready-to-use additives and spices. **Food Control**. v. 18, p. 421-429, 2007.

KANNER, J.; HAZAN, B.; DOLL, L. Catalytic "free" iron ions in muscle foods. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 36, n. 3, p.412-415, 1988.

KIOKIAS, S.; OREOPOULOU, V. Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.7, p.132-139, 2006.

KUNKELY, H.; VOGLER, A. Absorption and luminescence spectra of cochineal. **Inorganic Chemistry Communication**, v. 14, p. 1153-1155, 2011.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LIM, H. S.; CHOI, J. C.; SONG, S. B.; KIM, M. Quantitative determination of carmine in foods by high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.158, p.521-526, 2014.

LIMA, R. O. A.; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food color (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 189-192, 2003.

LIMA JÚNIOR, D.M.; RANGEL, A.H.N.; URBANO, S.A.; MORENO, G.M.B. Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinária Brasílica**, v.7, n.1, p.14-28, 2013. LIMBO, S.; TORRI, L.; SINELLI, N.; FRANZETTI, L.; CASIRAGHI, E. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. **Meat Science**, v.84, p.129-136, 2010.

LIRA, G. M.; SANT'ANA, A. E. G.; ARAÚJO, D. C. S.; MENEZES, M. E. S.; OLIVEIRA, F. R. Determinação de lipídios e colesterol em carnes bovina e suína comercializadas em Maceió. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.21, p.7-16, 2001.

LLOYD, A. G. Extraction and chemistry of cochineal. **Food Chemistry**, v.5, p.91-107, 1980.

MAGANHINI, M. B.; MARIANO, B.; SOARES, A. L.; GUARNIERI, P. D.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Carnes PSE (Pale, soft, exsudative) e DFD (dark, firm, dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 69-72, 2007

MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras – MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, 2006.

MORI, H.; IWATA, H.; TANAKA, T.; MORISHITA, Y.; MORI, Y.; KOJIMA, T.; OKUMURA, A. Carcinogenicity study of cochineal in B6C3F₁ mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 9, p. 585-588, 1991.

NAWAR, W. W. Lipídios. In: FENNEMA, O. **Química de los alimentos**, 2ª Ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

OHGIYA, Y.; ARAKAWA, F.; AKIYAMA, H. et al. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochineal allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, n. 5, p. 1158-1162, 2009.

OLIVEIRA, M. J.; ARAUJO, W. M.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

PACHECO, G. D.; LOZANO, A. P.; VINOKUROVAS, S. L.; SILVA, R. A. M.; DALTO, D. B.; AGOSTINI, P. S.; FONSECA, N. A. N.; BRIDI, A. M.; SILVA, C. A. Utilização do farelo de germen de milho desengordurado, como fonte de fitato, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.819-828, 2012.

PAPYRUS. **Sobre el cor de la carne.** Disponível em: <<http://www.gominolasdepetroleo.com/2011/09/sobre-el-color-de-la-carne-i.html>>. Acesso em: 25 de Maio de 2015.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; DE-CARVALHO, R. R.; ARAUJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1595-1601, 2002.

PIMENTEL, F.A; STRINGHETA, P.C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratores. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.3, 1999.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. Zaragoza: Acribia, 1994.

PRESTON, H.D.; RICKARD, M.D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v.5, p.47-56, 1980.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2004.

ROCHA GARCIA, C. E.; BOLOGNESI, V. J.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenóides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p.1510-1517, 2012.

ROCHA GARCIA, C. E.; CARVALHO, P. R. R. M.; BOLOGNESI, V. J. Aplicações e características do carmim de cochonilha utilizado em produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, v.461, p.15-19, 2015.

RODRIGUES, R. N. **A cochonilha vale ouro: narrativas cromáticas do carmim**. 154 f. Dissertação (Mestrado em Artes Visuais) – Instituto de Artes, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SATO, G. S.; CHABARIBERY, D.; MAIA, M. L.; CARVALHO, F. C.; NETO, A. N.; MARQUES, S. A. Tendência de mercado para corantes na indústria de alimentos. **Agricultura em São Paulo**, v. 39, n.1, p. 1-50, 1992.

SATYANARAYANA, A.; RAO, P. P.; RAO, D. G. Influence of source and quality on the color characteristics of annatto dyes and formulations. **LWT-Food Science and Technology**, v.43, p.1456-1460, 2010.

SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterisation of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 11, p. 301-315, 1994.

SIMÕES, M. R.; COSTA, T. A.; SOUZA, M. L.; HOLZBACH, J. C.; CARNEIRO, L. B.; GUBIANI, A. M. Análise físico-química de linguiças coloniais comercializadas no município de Toledo, Estado do Paraná e comparação com valores fornecidos pelos fabricantes. **Acta Scientiarum Technology**, v.31, n.2, p.221-224, 2009.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R.; MACEDO, M. R. P.; DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça fresca em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de Salmonella em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.2, p.107-112, 2014.

SPELLMEIER, J. G.; STÜLP, S. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fotoquímico. **ACTA Ambiental Catarinense**, v. 2, n. 1, p. 65-82, 2009.

TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M.; DUGAN JUNIOR, L. R. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of TBA-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 602-607, 1964.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 2003.

TESSMANN, C.; LIMA, A. S.; DUVAL, E. H.; MACEDO, M. R. P.; SILVA, W. P. **Prevalência de Salmonella sp. e Staphylococcus aureus em linguiças do tipo frescal derivadas de carne suína**. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001. Foz do Iguaçu, Resumos do XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3, 310-313, 2001.

TORRES, E.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I.; KU, P. K. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). **Food Chemistry**, v.32, p.257-268, 1989.

UYHARA, C. N. S.; OLIVEIRA FILHO, P. R. C.; TRINDADE, M. A.; VIEGAS, E. M. M. Adição de corantes em salsichas de tilápia do Nilo: efeito sobre a aceitação sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.4, p.271-278, 2008.

VENTURINI, A. C.; CAVENAGHI, A. D.; CASTILLO, C. J. C.; QUIÑONES, E. M. Sensory and microbiological evaluation of uncured fresh chicken sausage with reduced fat content. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 3, p. 629-634, 2011.

VOLTOLINI, S.; PELLEGRINI, S.; CONTATORE, M.; BIGNARDI, D.; MINALE, P. New risks from ancient food dyes: cochineal red allergy, **EUR. Ann. Allergy Clin. Immunol.**, v. 46, n. 6, p. 232-233, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Q & A on the carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat**. Disponível em: < <http://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/en/>>. Acesso em: 25 de Novembro de 2015.

WIRTH, F. Technologie der Verarbeitung von fleischmitab weichen der Beschaffenheit. **Fleischwirtschaft**, v. 65, p. 998-1001, 1986.

YOLMEH, M.; NAJAFI, M. B. H.; FARHOOSH, R. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v.155, p.319-324, 2014.

ZARRINGHALAMI, S.; SAHARI, M. A.; HAMIDI-ESFEHANI, Z. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. **Meat Science**, v.81, p.281-284, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1. Ficha de análise sensorial de ordenação de preferência em relação a cor vermelha de amostras contendo diferentes concentrações de carmim (10, 20, 30 e 40 ppm).

Nome:	Data:
Você está recebendo quatro amostras codificadas, avalie cada uma na ordem crescente de preferência em relação ao atributo cor.	
<div style="text-align: center;">_____</div>	
Menor preferência	Maior preferência
Comentários:	

ANEXO 2. Ficha de análise sensorial de ordenação de preferência em relação a cor vermelha de amostras 30 e 40 ppm de carmim comparadas as amostras comerciais.

Nome:	Data:
Você está recebendo cinco amostras codificadas, de lingüiças do tipo Toscana. Avalie cada uma na ordem crescente de preferência em relação ao atributo cor.	
<div style="text-align: center;">_____</div>	
Menor preferência	Maior preferência
Comentários:	

ANEXO 3. Ficha de análise sensorial de ordenação de preferência em relação a substituição do carmim de cochonilha e do nitrito de sódio pelo bixinato de potássio em amostras frescas de linguças do tipo Toscana.

Análise Sensorial de Preferência	
Nome: _____	Data: __/__/____
<p>Por favor, avalie visualmente as seis amostras codificadas de linguças frescas. Posteriormente, anote os códigos das amostras em ordem crescente de preferência em relação ao atributo cor.</p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> _____ _____ _____ _____ _____ _____ </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> Menor preferência Maior preferência </div> <div style="text-align: center;"> </div>	

ANEXO 4 Ficha de análise sensorial de ordenação de preferência em relação a substituição do carmim de cochonilha e do nitrito de sódio pelo bixinato de potássio em amostras assadas de linguças do tipo Toscana.

Análise Sensorial de Preferência	
Nome: _____	Data: __/__/____
<p>Por favor, avalie visualmente as seis amostras codificadas de linguças assadas. Posteriormente, anote os códigos das amostras em ordem crescente de preferência em relação ao atributo cor.</p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> _____ _____ _____ _____ _____ _____ </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> Menor preferência Maior preferência </div> <div style="text-align: center;"> </div>	

ANEXO 5. Ficha de análise sensorial de teste triangular em relação ao gosto de linguiça do tipo Toscana.

Análise Sensorial - Linguiça tipo Toscana		
Nome: _____		Data: __/__/__
Por favor, avalie as três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente. Identifique com um círculo a amostra diferente em relação ao gosto.		
173	751	917

ANEXO 6. Ficha de análise sensorial de ordenação de preferência em relação ao gosto de linguiça tipo Toscana.

Análise Sensorial de Linguiças tipo Toscana	
Nome: _____ Data: __/__/__	
Você está recebendo amostras codificadas de linguiças. Por favor, prove as amostras e identifique com um círculo a de maior preferência.	
321	426

ANEXO 7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Eu, Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia (orientador da pesquisa), pesquisador da Universidade Federal do Paraná e colaborador Paulo Roberto do Rêgo Monteiro de Carvalho – da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado "O Uso do Sal de bixina como substituto do carmim de cochonilha e do nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos".
- b) O objetivo desta pesquisa é verificar a substituição do corante carmim de cochonilha e do nitrito de sódio pelo sal de bixina.
- c) As informações coletadas serão tratadas de forma sigilosa e avaliadas sem citar o nome de qualquer participante.
- d) Estas informações servirão de subsídio para o desenvolvimento do projeto e futuras adequações tecnológicas.
- e) A sua participação neste estudo é voluntária. Contudo, se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá solicitar de volta o termo de consentimento livre esclarecido assinado.
- f) Caso você participe da pesquisa, será necessário o comparecimento no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, do Departamento de Farmácia, nos dias referentes às análises sensoriais, o que levará aproximadamente cerca de 5 minutos. As análises serão visuais e de degustação.
- g) As amostras disponibilizadas para o teste de aceitação sensorial foram manipuladas conforme normas de boas práticas de manipulação e fabricação, e estão de acordo com legislação sanitária.
- h) As amostras são compostas pelos seguintes ingredientes: carne e gordura suína, sal, alho, pimenta branca, manjerona, tripolifosfato de sódio, nitrito de sódio, carmim de cochonilha e urucum (sal de bixina). Caso eventualmente apresente intolerância ou alergia a algum dos componentes acima, notificar o aplicador.
- i) Os benefícios esperados com essa pesquisa são de que o sal de bixina seja uma fonte viável para a substituição tanto do carmim de cochonilha, como o nitrito de sódio em embutidos cárneos frescos. Nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Participar CEP/SD-PB nº 14326/19
na data de 01/07/2015

Participante da pesquisa e/ou Responsável Legal
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE
Orientador

- j) Os pesquisadores Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia e Paulo Roberto do R. M. de Carvalho, responsáveis por este estudo poderão ser localizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos, no Prédio de Farmácia, na Rua Prof. Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, e contatados pelos pesquisadores nos e-mails carlos.garcia@ufpr.br/paulorob_ufpr@yahoo.com.br ou telefone (41) 3360-4063 / 9198-1364, para esclarecer eventuais dúvidas e fornecer informações antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- k) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, localizado na Rua Padre Camargo, 285, térreo, bairro Alto da Glória, Curitiba ou pelo telefone 3360-7259.

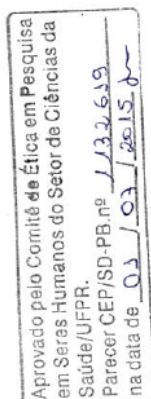
Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo

Curitiba, ____ de _____ de _____

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR - CEP/SD
Rua Padre Camargo, 285 - Térreo - Alto da Glória - Curitiba /PR - CEP 80060-240
cometica.saude@ufpr.br – telefone (41) 3360-7259